

Aus dem medizinischen Institut für Umwelthygiene an der
Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipkötter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER TERATOGENE EINFLÜSSE
VON CADMIUMCHLORID AUF DIE
EMBRYOGENESE DER RATTE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt
von

**Michael Gerigk
Dirk Haverkamp
Günter Schönwald
Klaus Spaether**

1982

Aus dem medizinischen Institut für Umwelthygiene an der
Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER TERATOGENE EINFLÜSSE
VON CADMIUMCHLORID AUF DIE
EMBRYOGENESE DER RATTE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt
von

**Michael Gerigk
Dirk Haverkamp
Günter Schönwald
Klaus Spaether**

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Brüster

Referent

gez.: Prof. Dr. med. Hilscher

Korreferent

gez.: Prof. Dr. med. Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Material und Methodik	10
Ergebnisse	13
I. Ergebnisse zum Tage 7 p.c.	13
II. Ergebnisse zum Tage 8 p.c.	14
III. Ergebnisse zum Tage 9 p.c.	16
IV. Ergebnisse zum Tage 10 p.c.	18
V. Ergebnisse zum Tage 11 p.c.	21
Diskussion	24
Zusammenfassung	33
Literaturverzeichnis	36
Anhang:	
Abbildungen und Tabellen	

E i n l e i t u n g

Die vorliegende Studie soll einen Beitrag zur schädigenden Wirkung von Cadmium auf die während der Embryogenese entstehenden und sich entwickelnden Gewebsverbände liefern. Von den drei Abschnitten der Keimentwicklung - B l a s t o g e n e s e , E m b r y o g e n e s e und F e t o g e n e s e - stellt die Embryogenese diejenige Entwicklungsperiode dar, in der der Keimling auf die Einwirkung von Noxen bevorzugt mit der Entstehung von Mißbildungen reagiert (Abb. 1). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Ratte als Modelltier gewählt. Bei der Ratte reicht die Blastogenese bis zum 14. Trächtigkeitstag und die Fetogenese bis zum 22. bzw. 23. Trächtigkeitstag (Rosenbauer, 1969, Abb. 2).

Die Befruchtung der Eizelle erfolgt bei der Ratte im ampullären Anteil der Tube. Es entsteht eine Zygote mit diploidem Kern, aus der nach mehreren Furchungsmitosen die Morula entsteht. Daraus entwickelt sich bis zum 4. Trächtigkeitstag die Blastozyste. Um den 6./7. Tag erfolgt die Nidation im antimesometralen Abschnitt der Uteruswand. Es entsteht die Primitivrinne; der Urdarm wird angelegt; am 10. Tag ist die Frucht dorsal gekrümmt. Um diese Zeit erscheinen die ersten 2 bis 3 Somitenpaare, deren Zahl sich bis zum 11. Tag auf etwa 26 erhöht. Gleichzeitig kommt es zur Differenzierung der Organfelder. Damit ist die Frühentwicklung der Frucht abgeschlossen.

In der sich daran anschließenden embryonalen Entwicklungsphase der Ratte differenzieren sich die angelegten Primitivorgane weiter aus, und die Extremitätenanlage wird sichtbar. Während der Fetalphase der Entwicklung bildet sich die Körperform aus, und das Skelett wird knorpelig vorgebildet und später ossifiziert. Die Organ- und Extremitätenreifung kommt zum Abschluß.

Am 23. Trächtigkeitstag ist die Entwicklung abgeschlossen, und

die jungen Ratten werden geboren.

In der vorliegenden Studie wurde die Einwirkung von Cadmium auf die Proliferationsaktivität embryonaler Gewebsverbände an den Tagen 7 - 11 post conceptionem (p.c.) untersucht. Im folgenden werden die wichtigsten Daten über die Entwicklungsabläufe in diesem Zeitabschnitt aufgeführt (Balinsky, 1970; Hagemann/Schmidt, 1960; Henneberg, 1937; New, 1966; Starck, 1975) und in einem orientierenden Schema (Abb. 3) dargestellt:

Am Tage 7 p.c. nehmen Eizylinder und Ekto-plazentarkonus der Keimblasen wie schon an den Vortagen weiter an Masse zu. Der Eizylinder ist schlanker und noch mehr zylindrisch geworden. In der antimesometralen Hälfte des Eizylinders ist ein spaltförmiges Lumen aufgetreten, das die beginnende Proamnionhöhle vorstellt. Der Eizylinder ist von dem einschichtigen, aus niedrigen, flachen Zellen bestehenden viszeralen Dotterentoderm bekleidet. Der Ekto-plazentarkonus hat im ganzen seine Kegelform beibehalten.

Am Tage 8 p.c. befindet sich der Keimling im Stadium der zweischichtigen Keimscheibe mit primärem Entoderm und Ektoderm. Der Eizylinder ist schmal und lang, mit einheitlicher Proamnionhöhle.

Am Tage 9 p.c., der als Frühentwicklung bezeichneten Phase im Verlauf der Embryonalentwicklung der Ratte, finden sich histologisch neben Entodermzellen und Ektodermzellen auch schon vereinzelt Mesodermzellen. Ebenso sollen in dieser Entwicklungsstufe die ersten Somitenpaare gebildet werden, nachdem zuvor die Einbuchtung der Primitivrinne erkennbar wurde und sich die ursprüngliche Keimscheibe in die charakteristische "Sandalenform" umgewandelt hat.

Am Tage 10 p.c. ist die Gastrulation weitgehend beendet. Der Rattenembryo befindet sich im sogenannten "Sandalenstadium"

oder finalen Stadium des Primitivstreifens. Er ist dorsal gekrümmt und, über die Rückenkonkavität gemessen, bis zu 1,5 mm lang. Sein Wachstum wird durch die Größenzunahme des queren Durchmessers der gesamten Anlage bestimmt.

Das Entoderm bildet die äußere Begrenzung des Eizylinders und stellt somit die Innenwand der Dottersackhöhle dar. Der im Inneren des Eizylinders gelegenen Amnionhöhle zugewandt, liegt das zur Medullarrinne geformte Neuroektoderm. Zwischen Ektoderm und Entoderm hat sich das Mesoderm als ungegliederte Anordnung von Zellen ausgebildet. Am occipitalen Teil des Embryos sondern sich jedoch hieraus median die ersten 1 bis 4 Somitenpaare ab. Durch Proliferation des extraembryonalen Mesenchyms entsteht am hinteren Embryonalende die Allantois. Sie schiebt sich in Gestalt eines kurzen, soliden Zapfens in das Exocoel vor, welches distal durch das Amnion von der Amnionhöhle, proximal durch das Chorion von der Ektoplazentarhöhle abgegrenzt ist. Auf der Kuppe des Eizylinders wandelt sich eine Gruppe hoher Entodermzellen zur Urdarmgrube um. Diese geht kranialwärts in die aus kubischen Zellen bestehende Chordaplatte über, welche noch überall in das Entoderm eingeschaltet ist. Von der Medullarrinne wird die Chordaanlage an keiner Stelle von Mesodermzellen getrennt. Diese treten erst seitlich davon auf.

Am Tage 10 p.c. beginnt mit der Ausbildung der bald rasch wachsenden Gehirnanlage und der Perikardhöhle die Phase der Organentstehung.

Am Tage 11 p.c. ist die morphologische Organterminierung weitgehend abgeschlossen.

Die äußere Körperform des Embryos wird in besonderem Maße bestimmt durch das rasche Wachstum des exzentrisch gelegenen Neuralrohres, das zu der dorsoventralen Krümmung des Keimes führt. Die schnelle Größenzunahme der Hirnanlage bedingt das für den Embryo typische Überwiegen des Kopfanteils. Die Encephalonhemisphären und das Mittelhirn werden ausgebildet und die Augenblasen angelegt.

Von kranial nach kaudal fortschreitend, nimmt die Zahl der parallel zum Neuralrohr angeordneten Somitenpaare auf etwa 26 zu. Die Seitenplatten entstehen; diese gliedern sich später in eine Somatopleura, aus der sich die Extremitäten bilden, und in eine Splanchnopleura, aus der die Lungen hervorgehen.

Am 11. Embryonaltag beginnt auch das Herz zu schlagen, und die Nabelschnur wird angelegt.

Durch Abschnürung vom Dottersack bildet sich das Darmrohr aus, das am oralen und analen Ende zunächst blind endet. Dann entsteht an beiden Enden eine Einsenkung, die Mundbucht bzw. die Kloakengrube. Wenn diese Einsenkungen mit dem Darmrohr in Verbindung treten, sind die Darmstien gebildet.

C a d m i u m wurde als einwirkende Noxe gewählt, weil es von den Schwermetallen als das stärkste Umweltgift angesehen wird (Christensen/Ohlsen, 1957). Es gefährdet bereits in Spuren Mensch und Ökosystem (Tyler, 1972).

Die Weltproduktion von Cadmium ist von 1962 bis 1972 von ca. 12.000 auf 16.500 t gestiegen; im gleichen Zeitraum stieg der Verbrauch von 11.800 auf ca. 17.000 t (Umweltbundesamt, 1977). In der Bundesrepublik Deutschland wurde Cadmium zum Beispiel im Jahre 1973 hauptsächlich bei folgenden Produktionen verwendet (Umweltbundesamt, 1977):

1. Pigmentherstellung (Farbpalette gelb, orange bis rot)	ca. 11.188 t
2. Stabilisatoren	ca. 478 t
3. Cadmium-Nickel-Batterien	ca. 470 t
4. Galvanisation	ca. 431 t
5. Legierungen	ca. 65 t
6. Andere	ca. 40 t

Zink ist häufig mit Cadmium vergesellschaftet, so daß allein

durch die Verarbeitung dieses weitverbreiteten Elementes eine Exposition mit Cadmium unumgänglich ist. Nach Nordberg (1974) wird in den USA pro Jahr doppelt so viel Cadmium wie Quecksilber verarbeitet. Die Zunahme der Cadmiumproduktion während der letzten 60 Jahre ist in einem im Jahre 1976 von Lauwerys veröffentlichten Bericht aufgeführt worden. Einen Überblick über die in der Umwelt enthaltenen Konzentrationen geben die folgenden Zahlen. In ländlichen Gebieten liegt die Cadmiumkonzentration der Luft normalerweise unter 3 ng/m^3 , in größeren Städten kann der Jahresdurchschnitt hingegen bis zu 50 ng/m^3 Luft betragen. Werte bis zu 500 ng/m^3 Luft wurden als Wochen- oder Monatsdurchschnitt in der Nähe von Cadmiumemittenten gemessen (Friberg et al., 1974).

Cadmium wirkt im Tierversuch deutlich teratogen (Abb. 4). Am 8. Gestationstag trächtigen Goldhamstern appliziertes CdCl_2 verursacht bei den Keimlingen Spaltenbildungen im Bereich des Gesichtschädels, wie z.B. ein- und zweiseitige Gaumenspalten, sowie Anophthalmie (Ferm, 1969 und 1971; Ferm/Carpenter, 1967; Gale/Ferm, 1973; Holmberg/Ferm, 1969; Mulvihill/Gamm/Ferm, 1970). Zusätzlich zu diesen Veränderungen wurden nach Injektion von Cadmium am 8. und 9. Trächtigkeitstag Mißbildungen an der Wirbelsäule, an den Rippen und dem Brustbein sowie an Vorder- und Hintergliedmaßen erzeugt (Gale/Ferm, 1973). Das bedeutet, daß alle Teile des Skelettsystems betroffen waren. Es scheint, daß die Art der Schädigung davon abhängt, zu welchem Zeitpunkt Cadmium während der Frühentwicklung verabfolgt wird. Schon eine Zeitverschiebung der Injektion um Stunden soll Auswirkungen auf das Schädigungsspektrum haben (Ferm, 1971). Bei Ratten konnten in Einzelfällen Mißbildungen des Gesichtes durch Cadmium erzeugt werden (Barr, 1973). Auch hier wurden Anophthalmie oder Mikrophthalmie beobachtet. Daneben traten Fehlbildungen der linken Vordergliedmaßen und des Schwanzes sowie vereinzelt Analatresien auf. Ishizu und. Mitarb. (1973) untersuchten die Wirkung von Cadmium auf Mäuseembryonen. Die nach Injektion

am 8. Trächtigkeitstag beobachteten Mißbildungen betrafen das Skelett, die Augen und den Schädel.

Cadmium hat nicht nur unterschiedliche Schädigungseffekte bei den verschiedenen Nagerspezies. Auch bei zwei Stämmen einer Tierart (Maus) können unterschiedliche Empfindlichkeiten auftreten (Wolkowski, 1974). Nachdem beiden Stämmen (NAW-wa-2+/Pr (NAW) sowie C57BL/10ChPr (B 10)) die gleiche Cadmiumkonzentration verabreicht worden war, wies der eine Stamm eine hohe Mortalität der Früchte auf (66 %), während die Sterberate des anderen nicht signifikant von der der Kontrolle abwich. Nach Kreuzung der beiden Stämme zeigte es sich, daß die Resistenz gegenüber Cadmium wie ein dominantes Merkmal vererbt wird: Die Mortalitätsrate der F_1 -Generation war gegenüber der des empfindlichen Stammes erniedrigt.

Barr (1973) wies nach, daß sogar zwei Linien eines Stammes (Wistar-Ratten) unterschiedlich empfindlich auf Cadmium reagierten. Sowohl die Resorptionsraten als auch die Art und Anzahl der Schädigungen differierten bei den beiden Linien signifikant voneinander.

Die Frage bleibt offen, ob Cadmium direkt oder indirekt, beispielsweise durch die Schädigung mütterlicher Organe oder der Plazenta, wirkt. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen über die Plazentarschranke mit radioaktivem Cadmium vorgenommen worden.

Bei Goldhamstern und Mäusen wurde beobachtet, daß Cadmium in den ersten Trächtigkeitstagen den Embryo erreicht, ohne die Plazenta zu passieren. Vermutet wird ein Austausch über Dottersack und Urdarm (Dencker, 1975).

Lucis u. Mitarb. (1972) fanden meßbare Konzentrationen von ¹⁰⁹Cadmium nach Applikation während der Trächtigkeit (leider

wird der Injektionstermin nicht genannt) in der Leber, im Intestinaltrakt und im Hirngewebe der neugeborenen Ratten. Cumbrowski u. Mitarb. (1975) interpretierten diese Arbeit dahingehend, daß "man sich die durch Cadmium bedingten teratogenen Schäden als Auswirkung einer durch das Muttertier durchgemachten Schwangerschaftstoxikose" vorzustellen hat.

Ab dem 18. Trächtigkeitstag passiert Cadmium die Plazenta nicht mehr (Ishizu et al., 1973). Nach Parizek et al. (1968) und Ishizu u. Mitarb. (1973) gilt die Plazenta als Hauptschädigungsort.

Nach den Angaben von Hurley und Swenerton (1966) werden zinkfrei ernährte Ratten nicht trächtig. Wie diese Autoren weiter berichteten, bewirkte ein über einen längeren Zeitabschnitt bestehender Zinkmangel - genaue Angaben über die Dauer des Versuches sind der Arbeit nicht zu entnehmen - schwere Mißbildungen der Feten, die u.a. das Skelett (fehlende Wirbel, Rippenschäden, Skoliose, Mikrognathie und Agnathie, Syndaktylie, kurze Gliedmaßen, Fehlen des Schwanzes) betrafen sowie als klaffende Fontanellen, Hydrozephalus, Mikrophthalmie und Anophthalmie, Hernien, Herz-, Lungen- und Urogenitalabnormitäten hervortraten. Analysen des Zinkgehaltes der Früchte ergaben geringere Zinkkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Autoren vermuten einen direkten Effekt durch Zinkmangel des embryonalen Gewebes und nicht eine indirekte Wirkung durch den mütterlichen Stoffwechsel. Diese Befunde leiten über zu Angaben von Copius Peereboom-Stegeman (1980), wonach es bei weiblichen Ratten, die mit CdCl_2 behandelt worden waren, nicht zur Implantation der Blastozysten kommt. Als Ursache werden allerdings Gefäßveränderungen des Uterus angegeben. Daß eine einmalige CdCl_2 -Gabe (0,5 mg/100 g KG) zu Alterationen in der Mikrozirkulation des Uterus führt, hatten Copius Peereboom-Stegeman und Jongstra-Spaapen 1979 berichtet.

In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Ferm und Carpenter (1967 u. 1968) sowie von Gale (1973) von Interesse, die ergaben, daß Zink bei gleichzeitiger, äquimolarer Applikation

mit Cadmium eine Schutzwirkung auf die Embryonalentwicklung ausübt, ohne jedoch die Konzentration von Cadmium im Embryo herabzusetzen (Ferm/Hanlon, 1974).

Auch die erwähnten Versuche von Wolkowski (1974) zeigen, daß eine bestimmte Konzentration von Cadmium im Embryo noch nicht zwingend eine Schädigung oder Resorption hervorrufen muß. In den Embryonen beider untersuchter Mäusestämme (siehe Seite 6) fand er trotz der unterschiedlichen Mortalitätsrate keinen signifikanten Unterschied der Cadmiumkonzentration.

Ob es bei der Entstehung von Mißbildungen zu einer Hemmung von Zink durch Cadmium in zinkabhängigen Enzymen, z.B. alkalischen Phosphatasen, kommt und dieses eine Rolle spielt, steht noch nicht fest. Ferm u. Mitarb. (1969) fanden bei Goldhamsterkeimlingen nach Cadmiumgabe am 8. Trächtigkeitstag keine Abnahme der alkalischen Phosphatase. Im Gegensatz dazu stellten Hilscher und Hilscher (1978) bei enzymhistochemischen Untersuchungen von 9 und 10 Tage alten Rattenembryonen, deren Muttertiere 24 Stunden zuvor i.p. eine einmalige Gabe von CdCl_2 (Dosen: 5 mg, 2,5 mg, 1,25 mg und 0,63 mg pro kg Körpergewicht) erhalten hatten, eine Abschwächung der alkalischen Phosphatasen in verschiedenen embryonalen Gewebsverbänden und der den Keimling umgebenden Decidua fest. Wolkowski (1974) kann auch die Vermutung nicht unterstützen, daß die toxische Wirkung von Cadmium - gebunden an Metallothionein - gegenüber freiem Cadmium vermindert ist, wie es für die Testes erwiesen wurde. In geschädigten Mäuseembryonen konnte er kein freies, sondern nur an Protein gebundenes Cadmium analysieren.

Selen ist, im Gegensatz zu Zink, kein essentielles Element. Verabfolgt man es jedoch gleichzeitig mit Cadmium, wird die teratogene Wirkung von Cadmium deutlich verringert (Holmberg/Ferm, 1969; Parizek et al., 1968). Dabei konnte beobachtet werden, daß der Cadmiumgehalt der Plazenta nicht verringert, sondern im

Gegenteil erhöht wurde (Parizek et al., 1968).

In der vorliegenden Studie wurde die Einwirkung von Cadmium auf die Embryonalentwicklung anhand des ^3H -Markierungsindex verschiedener embryonaler Gewebsverbände nach i.p. Injektion trächtiger Ratten mit ^3H -Thymidin untersucht. Der ^3H -Markierungsindex gibt den prozentualen Anteil der durch ^3H -Thymidin markierten, in DNA-Synthese befindlichen Zellen an der Gesamtzellzahl einer bestimmten Zellpopulation, im vorliegenden Fall des untersuchten Gewebsverbandes, wieder: Ein ^3H -Markierungsindex von z.B. 0.33 bzw. 33 % gibt an, daß sich 33 von 100 Zellen des untersuchten Gewebsverbandes - einschließlich der Mitosen - in der DNA-Synthese befinden. Ein hoher ^3H -Markierungsindex zeigt eine starke, ein niedriger ^3H -Markierungsindex eine schwache Proliferationsaktivität an. Walber (1979), der den schädigenden Effekt von Cadmium auf die Embryo- und Fetogenese der Ratte untersuchte, hatte u.a. diesen Parameter benutzt, um die Proliferationsaktivität des Neuroektoderms und des Mesoderms nach Cadmиеinwirkung am Tag 10 p.c. zu bestimmen.

M a t e r i a l u n d M e t h o d i k

Die 60 untersuchten Rattenembryonen (3 pro Muttertier) stammen von insgesamt 20 Muttertieren, die in 5 Gruppen zu 4 Tieren (A,B,C und D) zusammengefaßt und an den Trächtigkeitstagen 7 (Gruppe I), 8 (Gruppe II), 9 (Gruppe III), 10 (Gruppe IV) und 11 (Gruppe V) getötet worden waren.

Die benötigten Rattenembryonen waren auf folgende Weise gewonnen worden: Jeweils 1 Männchen kam um 16.00 Uhr in einen Käfig mit 6 Weibchen (Wistarratten der Tierversuchsanlage Hannover). Am nächsten Tag zwischen 7.30 Uhr und 8.30 Uhr erfolgte bei jedem der 6 Weibchen ein Vaginalabstrich zum Spermiennachweis. Ergab der Ausstrich Spermien, so wurden die betreffenden Tiere als trächtig angesehen. Der Tag des Spermiennachweises galt als der erste Tag der Trächtigkeit. An den Trächtigkeitstagen 7, 8, 9, 10 und 11 (Versuchsgruppen I, II, III, IV und V) erhielt ein jedes Muttertier entsprechend seinem Gewicht eine einmalige, vorher errechnete Menge CdCl_2 i.p., und zwar

jeweils: 5 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier A
 2,5 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier B
 1,25 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier C
 0,63 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier D

6 Stunden danach erhielt jedes Muttertier eine i.p. Gabe von 2 mCi ^3H -Thymidin pro 300 g Körpergewicht ((methyl- ^3H)THYMIDINE, 5,0 Ci/mmol; Amersham Buchler, Braunschweig). 1 Stunde später erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle der trächtigen Muttertiere in tiefer Äthernarkose und die Exstirpation des Uterus. Anschließend wurden die Muttertiere getötet. Es wurden mithin für jeden Trächtigkeitstag 3 Embryonen pro Dosis ausgewertet, die allerdings aus Kostengründen von nur einem Muttertier stammten.

Die als umschriebene Auftreibungen der Uterushörner imponierenden Embryonen kamen zusammen mit der umgebenden Uterusmuskulatur

in Bouinsche Lösung. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Uterusaufreibungen mit den darin enthaltenen Embryonen in Paraplast eingebettet. Danach erfolgte die Anfertigung von 4µm dicken Serienschnitten bei jeweils drei Embryonen eines jeden Muttertieres, und zwar aus dem Bereich des Uterusanfangs, der Uterusmitte und des Uterusendes, wechselweise aus dem linken und rechten Horn.

Die Herstellung der Autoradiogramme erfolgte nach dem Dipping-Verfahren mit K₂-Emulsion (Ilford, England). Die Expositionsdauer betrug 14 Tage bei +4°C, die Entwicklungsdauer der Autoradiogramme 5 min, die Zwischenwässerung 1/2 min, die Fixierung 10 min bei + 18°C und die Entwässerung 60 min. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin über 8 min.

Entsprechend dem Differenzierungsgrad an den einzelnen Trächtigkeits- bzw. Embryonaltagen erfolgte - möglichst an 1.000 Zellen bzw. Zellkernen pro Gewebsverband je Tier (Tabelle 1) - die Bestimmung des ³H-Markierungsindex folgender Gewebsverbände:

primäres Ektoderm - Versuchsgruppe I -

durch den Auswerter Gerigk,

primäres Ektoderm und primäres Entoderm - Versuchsgruppe II -

durch den Auswerter Gerigk,

Neuoektoderm und Entoderm - Versuchsgruppe III -

durch den Auswerter Spaether,

Neuroektoderm, Entoderm und Mesoderm - Versuchsgruppe IV -

durch den Auswerter Haverkamp,

Neuralrohr, Somiten und Darmanlage - Versuchsgruppe V -

durch den Auswerter Schönwald.

Als markiert galten dabei Zellkerne, die 5 Silberkörner und mehr aufwiesen.

Zusätzlich wurde der ³H-Markierungsindex des parietalen Entoderms, das der Reichertschen Membran angelagert ist, an den Embryonaltagen 9, 10 und 11 bestimmt.

Bei den Embryonen der Versuchsgruppen I, II und III war es mangels einer ausreichenden Zellzahl nicht möglich, 1.000 Zellen bzw. Zellkerne pro Gewebsverband je Tier auszuwerten (Tabelle 1). Als unbehandelte "Kontrollembryonen" dienten insgesamt 10 Keimlinge von 5 Muttertieren (2 pro Muttertier), die wie die Muttertiere der Versuchsgruppen I - V an den Trächtigkeitstagen 7, 8, 9, 10 und 11 getötet worden waren (Tabelle 2); sie hatten wie die Muttertiere der Versuchsgruppen 1 Stunde vor der Tötung 2 mCi ³H-Thymidin pro 300 g Körpergewicht erhalten. Die Auswertung dieser Kontrollembryonen erfolgte durch Herrn Dreves und Frau Möllers, welche die Proliferationsaktivität embryonaler Gewebe vom 7. bis zum 14. Trächtigkeitstag untersucht hatten.

E r g e b n i s s e

Am Tage 7 p.c. ist die Nidation abgeschlossen. Schnitte durch den Keimling zeigen:

- (1) den aus Ektoplazentarkonus und Embryonalbereich bestehenden Keimling mit schwer voneinander abgrenzbarem Entoderm und Ektoderm und
- (2) den Dottersack.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen des zur Hauptsache aus Ektoderm bestehenden Keimlings sind in den Abbildungen 6 und 25 niedergelegt. Die Zusammenfassung der unmarkierten und markierten Zellkerne in drei Gruppen bzw. Kollektive zu 0 - 4 Silberkörnern pro Kern, 5 - 9 Silberkörnern pro Kern und 10 und mehr Silberkörnern pro Kern ist in der Abb. 6 dokumentiert. Im Einklang mit den Auswertungen der Autoradiogramme der Embryonen, die an den Tagen 8, 9, 10 und 11 p.c. CdCl_2 erhalten hatten, wurden sämtliche Kerne, die 5 und mehr Silberkörner aufwiesen, als markiert angesehen. Die Silberkornzahl 5 pro Kern lag mit Sicherheit über dem von Autoradiogramm zu Autoradiogramm gemessenen Nulleffekt.

In der Abb. 6 sind die Werte für die zu drei Kollektiven zusammengefaßten Zellen mit unterschiedlicher Silberkornzahl pro Versuchsgruppe in Form von Säulen dargestellt. Jede der Säulen enthält die Werte für einen Embryonen, untergliedert in die Kollektive 1 (0 - 4 Silberkörner pro Kern), 2 (5 - 9 Silberkörner pro Kern) und 3 (10 und mehr Silberkörner pro Kern).

Ein wesentlicher Unterschied in der Größe der drei Kollektive zwischen den vier Versuchsgruppen A (5 mg CdCl_2 /kg KG pro trächtige Ratte), B (2,5 mg CdCl_2 /kg KG pro trächtige Ratte), C (1,25 mg CdCl_2 /kg KG pro trächtige Ratte) und D (0,63 mg

CdCl₂/kg KG pro trächtige Ratte) findet sich nur bei den Zellen des Keimlingsbereiches der Versuchsgruppe C im Vergleich mit den übrigen Versuchsgruppen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen CdCl₂-Dosen offensichtlich keinen unterschiedlichen Effekt auf den Einbau von ³H-Thymidin in die Zellen des Keimlingsbereiches zur Folge hatte. (siehe Tab. 3)

In der Abb. 25 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen für den ³H-Markierungsindex in Form von Säulen graphisch dargestellt. Diese Werte basieren auf der Anzahl von Kernen mit 5 und mehr Silberkörnern.

Die Werte für den ³H-Markierungsindex und dessen Standardabweichung des zur Hauptsache aus Ektoderm bestehenden Keimlingsbereiches betragen nach Gabe von

(A) 5 mg CdCl ₂ /kg KG	86,94 ± 8,13,
(B) 2,5 mg CdCl ₂ /kg KG	86,76 ± 1,93,
(C) 1,25 mg CdCl ₂ /kg KG	70,45 ± 8,10 und
(D) 0,63 mg CdCl ₂ /kg KG	91,65 ± 4,56.

Am Tage 8 p.c. befindet sich der Keimling im Stadium der zweischichtigen Keimscheibe mit primärem Entoderm und Ektoderm.

Schnitte durch den Keimling zeigen folgende Einzelheiten:

- (1) die Schicht der großkernigen Trophoblastzellen,
- (2) die dünnwandige Reichertsche Membran mit den angelagerten Zellen des parietalen Entoderms,
- (3) den Dottersack,
- (4) den Ekto-plazentarkonus mit der
- (5) präsumptiven Ekto-plazentar- plus Amnionhöhle,
- (6) das viszerale Entoderm und
- (7) das Ektoderm.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen des Entoderms und des Ektoderms sind den Abbildungen 7, 8, 26 und 27 niedergelegt.

Ein wesentlicher Unterschied in der Größe der drei Kollektive zwischen den vier Versuchsgruppen A, B, C und D findet sich

- (1) bei den Zellen des Entoderms nicht,
- (2) bei den Zellen des Ektoderms in Form eines Anstiegs der Markierung der Zellkerne mit steigender CdCl_2 -Dosis. Hierbei handelt es sich jedoch um einen Scheineffekt, da die Werte für die höchste Dosis denjenigen der Kontrolluntersuchung entsprechen. (siehe Tab. 3)

Die Ergebnisse zeigen, daß

- (1) die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen CdCl_2 -Dosen offensichtlich keinen unterschiedlichen Effekt auf den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen des Entoderms der Embryonen zur Folge hatte,
- (2) die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen CdCl_2 -Dosen den gleichen Effekt auf die Zellen des Ektoderms wie bei 1 hatte.

Die Werte für den ^3H -Markierungsindex und dessen Standardabweichung

des Gewebsverbandes Entoderm betragen nach Gabe von

(A) 5	mg CdCl_2 /kg KG	62,01 $\pm$ 16,66,
(B) 2,5	mg CdCl_2 /kg KG	61,01 $\pm$ 4,59,
(C) 1,25	mg CdCl_2 /kg KG	72,72 $\pm$ 4,02 und
(D) 0,63	mg CdCl_2 /kg KG	71,56 $\pm$ 7,18,

des Gewebsverbandes Ektoderm betragen nach Gabe von

(A) 5	mg CdCl_2 /kg KG	88,60 $\pm$ 3,94,
(B) 2,5	mg CdCl_2 /kg KG	84,68 $\pm$ 3,88,
(C) 1,25	mg CdCl_2 /kg KG	81,24 $\pm$ 2,81 und
(D) 0,63	mg CdCl_2 /kg KG	79,77 $\pm$ 3,30.

Am Tage 9 p.c. erfolgt die Gastrulation. Schnitte durch den Keimling zeigen von außen nach innen:

- (1) die Schicht der großkernigen Trophoblastzellen,
- (2) die dünnwandige Reichertsche Membran mit den angelagerten Zellen des parietalen Entoderms,
- (3) den Dottersack,
- (4) den Plazentarkonus mit der
- (5) Ektoplazentarhöhle,
- (6) das (viszerale) Entoderm,
- (7) das (Neuro-)ektoderm,
- (8) das zwischen Entoderm und (Neuro-)ektoderm entstehende Mesoderm und
- (9) die von der Innenseite des (Neuro-)ektoderms begrenzte Mark-amnionhöhle, aus der die Amnionhöhle hervorgeht.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen des der Reichertschen Membran anliegenden parietalen Entoderms, des viszeralen Entoderms und des (Neuro-)ektoderms sind in den Abbildungen 9, 10, 11, 28, 29 und 30 niedergelegt.

Ein wesentlicher Unterschied in der Größe der drei Kollektive zwischen den vier Versuchsgruppen A, B, C und D findet sich

- (1) bei den Zellen des parietalen Entoderms bzw. der Reichertschen Membran nicht,
- (2) bei den Zellen des (viszeralen) Entoderms zwischen den Versuchsgruppen A und B einerseits und den Versuchsgruppen C und D andererseits,

- (3) bei den Zellen des (Neuro-)ektoderms zwischen der Versuchsgruppe A einerseits und den Versuchsgruppen B, C und D andererseits.

Die Ergebnisse zeigen, daß

- (1) die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen CdCl_2 -Dosen offensichtlich keinen unterschiedlichen Effekt auf den Einbau von ^3H -Thymidin in die Kerne der Zellen der Reichertschen Membran der Embryonen zur Folge hatte,
- (2) die Zellen des (viszeralen) Entoderms unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 weniger ^3H -Thymidin eingebaut hatten, wenn den Muttertieren 5 oder 2,5 mg CdCl_2/kg KG verabfolgt worden war,
- (3) die Zellen des (Neuro-)ektoderms unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 weniger ^3H -Thymidin eingebaut hatten, wenn den Muttertieren 5 mg CdCl_2/kg KG verabfolgt worden war.

Die Werte für den ^3H -Markierungsindex und dessen Standardabweichung

des Gewebsverbandes parietales Entoderm betragen nach
Gabe von

(A) 5	mg CdCl_2/kg KG	$54,5 \pm 11,75,$
(B) 2,5	mg CdCl_2/kg KG	$69,9 \pm 6,19,$
(C) 1,25	mg CdCl_2/kg KG	$54,8 \pm 7,26$ und
(D) 0,63	mg CdCl_2/kg KG	$51,9 \pm 11,61,$

des Gewebsverbandes (viszerales) Entoderm betragen nach
Gabe von

(A) 5	mg CdCl_2/kg KG	$35,2 \pm 6,31,$
(B) 2,5	mg CdCl_2/kg KG	$63,4 \pm 5,89,$

(C) 1,25 mg CdCl ₂ /kg KG	93,3 $\pm$ 5,99 und
(D) 0,63 mg CdCl ₂ /kg KG	84,4 $\pm$ 4,82,

des Gewebsverbandes (Neuro-)ektoderm betragen nach Gabe von

(A) 5 mg CdCl ₂ /kg KG	42,0 $\pm$ 12,57,
(B) 2,5 mg CdCl ₂ /kg KG	72,8 $\pm$ 7,24,
(C) 1,25 mg CdCl ₂ /kg KG	75,5 $\pm$ 3,83 und
(D) 0,63 mg CdCl ₂ /kg KG	68,3 $\pm$ 6,67.

Am Tage 10 p.c. ist die Gastrulation weitgehend abgeschlossen. Schnitte durch den Keimling zeigen folgende Einzelheiten:

- (1) die Schicht der großkernigen Trophoblastzellen,
- (2) die dünnwandige Reichertsche Membran mit den angelagerten Zellen des parietalen Entoderms,
- (3) den Dottersack,
- (4) das Entoderm,
- (5) die in das Darmdach einbezogene Chordaplatte,
- (6) das Mesoderm,
- (7) das Neuroektoderm,
- (8) die von der Innenseite des Neuroektoderms begrenzte Amnionhöhle,
- (9) das Amnion,
- (10) das Exocoel,
- (11) die entstehende Allantois,
- (12) den Ekto-plazentarkonus mit der
- (13) Ekto-plazentarhöhle.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen des Neuroektoderms, des (viszeralen) Entoderms in seinen embryonalen und extraembryonalen Anteilen, der Zellen der Reichertschen Membran sowie des ungegliederten Mesoderms sind in den Abbildun-

gen 12, 13, 14, 15, 16, 31, 32, 33, 34 und 35 niedergelegt.
Ein wesentlicher Unterschied in der Größe der Kollektive zwischen den vier Versuchsgruppen A, B, C und D findet sich

- (1) bei den Zellen des Neuroektoderms zwischen den Versuchsgruppen A und B einerseits und den Versuchsgruppen C und D andererseits,
- (2) bei den Zellen des embryonalen Entoderms in Form eines mäßiggradigen Anstiegs des Markierungsgrades mit abfallender Dosis,
- (3) bei den Zellen des extraembryonalen Entoderms zwischen jeder Versuchsgruppe und den ihr benachbarten bei gleichmäßig ansteigendem Markierungsgrad von der Versuchsgruppe A bis zur Versuchsgruppe D,
- (4) bei den Zellen der Reichertschen Membran zwischen der Versuchsgruppe A einerseits und den Versuchsgruppen B, C, und D andererseits,
- (5) bei den Zellen des ungegliederten Mesoderms zwischen den Versuchsgruppen A, B und C einerseits und der Versuchsgruppe D andererseits.

Die Ergebnisse zeigen, daß

- (1) die Zellen des Neuroektoderms unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 weniger ^3H -Thymidin eingelagert hatten, wenn den Muttertieren 5 oder 2,5 mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$ verabfolgt worden war,
- (2) die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen CdCl_2 -Dosen offensichtlich keinen unterschiedlichen Effekt auf den Einbau von ^3H -Thymidin in die Kerne des embryonalen Entoderms der Embryonen zur Folge hatte,
- (3) die Zellen des extraembryonalen Entoderms unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 kontinuierlich umso weniger ^3H -Thymidin eingebaut hatten, je höher die den Muttertieren applizierte CdCl_2 -Dosis gewesen war,

- (4) die Zellen der Reichertschen Membran unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 eine geringere Menge ^3H -Thymidin in die Zellkerne aufgenommen hatten, wenn der trächtigen Ratte 5 mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$ verabfolgt worden war,
- (5) die Zellen des ungegliederten Mesoderms unter der (direkten oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 bei den Dosen 5, 2,5 und 1,25 mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$ weniger ^3H -Thymidin eingelagert hatten.

Die Werte für den ^3H -Markierungsindex und dessen Standardabweichung

des Gewebsverbandes Neuroektoderm betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	77,75	±	2,66,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	82,39	±	1,53,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	91,46	±	4,79 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	89,96	±	10,34,

des Gewebsverbandes embryonales Entoderm betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	51,30	±	4,19,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	61,28	±	6,57,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	57,80	±	2,76 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	63,99	±	4,34,

des Gewebsverbandes extraembryonales Entoderm betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	40,01	±	18,11,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	57,19	±	7,71,

(C) 1,25 mg CdCl_2 /kg KG	62,20 + 5,56 und
(D) 0,63 mg CdCl_2 /kg KG	71,51 + 1,77,

des Gewebsverbandes parietales Entoderm betragen nach
Gabe von

(A) 5 mg CdCl_2 /kg KG	41,42 + 6,65,
(B) 2,5 mg CdCl_2 /kg KG	52,78 + 3,47,
(C) 1,25 mg CdCl_2 /kg KG	52,02 + 3,73 und
(D) 0,63 mg CdCl_2 /kg KG	48,14 + 2,74,

des Gewebsverbandes ungegliedertes Mesoderm betragen
nach Gabe von

(A) 5 mg CdCl_2 /kg KG	59,91 + 6,49,
(B) 2,5 mg CdCl_2 /kg KG	65,59 + 3,74,
(C) 1,25 mg CdCl_2 /kg KG	65,37 + 1,93 und
(D) 0,63 mg CdCl_2 /kg KG	75,07 + 3,75.

Am Tage 11 p.c. ist die Neurulation noch nicht abgeschlossen.
Schnitte durch den Keimling zeigen folgende Einzelheiten:

- (1) die dünnwandige Reichertsche Membran mit den angelagerten Zellen des parietalen Entoderms,
- (2) den Dottersack,
- (3) den Keimling selbst mit
- (4) der Hirnanlage,
- (5) den Augenblasen,
- (6) dem Herz,
- (7) der Aorta,
- (8) der Darmanlage,
- (9) den Seitenplatten,
- (10) den Somiten und
- (11) dem Neuralrohr.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen der

parietalen Entodermzellen bzw. Zellen der Reichertschen Membran,
der Darmanlage, des Neuralrohres und der Somiten sind in den
Abbildungen 17, 18, 19, 20, 36, 37, 38 und 39 niedergelegt.
Ein wesentlicher Unterschied in der Größe der Kollektive zwischen
den vier Versuchsgruppen A, B, C und D findet sich

- (1) bei den Zellen der Reichertschen Membran zwischen den Ver-
suchsgruppen A und B einerseits und den Versuchsgruppen
C und D andererseits, jedoch in dem Sinne, daß der Markie-
rungsgrad mit zunehmender CdCl_2 -Dosis ansteigt,
- (2) bei den Zellen der Darmanlage nicht,
- (3) bei den Zellen des Neuralrohres nicht,
- (4) bei den Zellen der Somiten ebenfalls nicht.

Die Ergebnisse zeigen, daß

- (1) die Zellen der Reichertschen Membran unter der (direkten
oder indirekten) Wirkung von CdCl_2 weniger ^3H -Thymidin
eingebaut hatten, wenn den Muttertieren 1,25 oder 0,63 mg
 $\text{CdCl}_2/\text{kg Kg}$ verabfolgt worden war,
- (2) die Injektion der trächtigen Ratten mit unterschiedlich hohen
 CdCl_2 -Dosen offensichtlich keinen unterschiedlichen Effekt
auf den Einbau von ^3H -Thymidin in die Kerne der Darmanlage,
des Neuralrohres und der Somiten der Embryonen zur Folge
hatte.

Die Werte für den ^3H -Markierungsindex und dessen Standardabweichung

des Gewebsverbandes parietales Entoderm betragen nach
Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	82,2 $\pm$ 7,07,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	87,9 $\pm$ 4,67,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	64,2 $\pm$ 12,16 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	62,7 $\pm$ 10,84,

des Gewebsverbandes Darmanlage betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	81,8 $\pm$ 26,30,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	90,9 $\pm$ 15,46,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	83,6 $\pm$ 27,39 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	87,7 $\pm$ 9,05,

des Gewebsverbandes Neuralrohr betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	89,4 $\pm$ 6,22,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	75,8 $\pm$ 52,18,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	91,5 $\pm$ 5,32 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	96,1 $\pm$ 2,92,

des Gewebsverbandes der Somiten betragen nach Gabe von

(A) 5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	95,3 $\pm$ 5,23,
(B) 2,5	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	94,2 $\pm$ 4,81,
(C) 1,25	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	86,4 $\pm$ 13,20 und
(D) 0,63	mg $\text{CdCl}_2/\text{kg KG}$	92,1 $\pm$ 10,94.

D i s k u s s i o n

Eine von Walber (1979) durchgeführte Pilotstudie an CdCl_2 -behandelten Rattenembryonen und -feten ergab u.a., daß CdCl_2 , das trächtigen Ratten am 10. Gestationstag verabreicht worden war, ab einer Dosis von 2,5 mg/kg KG die Proliferationsaktivität des Neuroektoderms und des Mesoderms der Embryonen nennenswert hemmt. Bestimmt worden war, wie in der vorliegenden Studie auch, die Silberkorndichte pro 1.000 Zellkerne je Gewebsverband. Die trächtigen Tiere hatten 1 h vor der Tötung i.p. ^3H -Thymidin erhalten, nachdem ihnen 6 h vorher CdCl_2 verabreicht worden war. Wie Walber hervorhob, war der ^3H -Markierungsindex sowohl bei den Kontrollembryonen als auch bei den Versuchsembryonen, deren Muttertiere 0,63 mg und 1,25 mg CdCl_2 /kg KG erhalten hatten, außerordentlich hoch: So fanden sich sowohl im intraembryonalen Mesenchym als auch in der Wand des Neuralrohres 70 - 80 % markierte Zellen. Das bedeutet, daß zum Zeitpunkt der Injektion 70 - 80 % der Keimlingszellen dieser beiden Gewebsverbände Desoxyribonukleinsäure synthetisierten bzw. sich in der S-Phase (Synthesephase) befanden. Dieser Befund wird durch Angaben in der Literatur ergänzt, nach denen Mäusekeimlinge nach der Implantation, vor allem aber zu Beginn und während der Gastrulation, eine außerordentlich starke Proliferation zeigen (Snow, 1976). Wurden vor der Gastrulation, an den Tagen 5,5 und 6,5 p.c., durchschnittlich 89 bzw. 238 Entodermzellen sowie 105 bzw. 552 Ektodermzellen gefunden, so lagen die Durchschnittswerte während der Gastrulation, am Tage 7,5 p.c., bei 770 (Entoderm), 6.600 (Mesoderm) und 8.740 (Ektoderm). Das bedeutet, daß vor allem die Ektoderm- sowie die Mesodermzellen bzw. deren Vorläufer, die zunächst im Verband des "primären Ektoderms" gelegenen "präsumptiven Mesodermzellen", besonders stark proliferieren. Die errechneten Generationszeiten betrugen weniger als 5 h für das Ektoderm und mehr als 5 h für das Mesoderm. Die gegenüber dem Entoderm wesentlich stärkere Proliferation des Ektoderms kam auch in dessen höherem Mitoseindex zum Ausdruck.

Ein Vergleich der bei Maus und Ratte gefundenen Werte über die Proliferationsaktivität der einzelnen Keimblätter und deren Abkömmlinge mit den in Abb. 1 aufgeführten "kritischen Zeitabschnitten" für die Entstehung von Mißbildungen beim Menschen während der Embryogenese legte den Gedanken nahe, daß möglicherweise die starke Proliferationsaktivität vor allem des Mesoderms und (Neuro-)ektoderms und deren Abkömmlinge mit der Entstehung von Mißbildungen in einem ursächlichen Zusammenhang steht.

Dafür sprechen u.a. auch die Befunde von Walber (1979) selbst, der, wie bereits erwähnt, eine nennenswerte Abnahme der Proliferationsaktivität von embryonalen Gewebsverbänden nach Einwirkung höherer Dosen von CdCl_2 fand.

Die Untersuchungsergebnisse von Walber (1979) dienten sowohl (a) als Grundlage für kürzlich abgeschlossene Markierungsversuche mit ^3H -Thymidin an Rattenembryonen (Dreves und Möllers, 1981), als auch (b) für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen.

Wie Dreves und Möllers (1981) nachweisen konnten, ist die Anzahl der proliferierenden Zellen der verschiedenen embryonalen Gewebsverbände außerordentlich hoch (Abb. 5): An den Trächtigkeitstagen 7 - 14, d.h. an den Tagen 7 - 14 p.c., liegt der ^3H -Markierungsindex des Ektoderms bzw. des aus diesem hervorgehenden Neuroektoderms und Mesoderms zwischen 75 % und 90 %, der des Entoderms zwischen 50 % und 90 % und der der Zellen der Reichertschen Membran bei etwa 60 %.

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Auswertungsergebnisse bestätigen die von Dreves und Möllers (1981) gemachten Angaben über eine außerordentlich hohe Proliferationsrate der untersuchten embryonalen Gewebsverbände. Als Maß für die Proliferationsaktivität wurden (1) die Silberkorndichte herangezogen (Abb. 6 - 24), vor allem aber (2) die ^3H -Markierungsindices (Abb. 25 - 39). Dabei wurde davon ausgegangen, daß Kerne mit einer Dichte

von 5 und mehr Silberkörnern als markiert anzusehen seien. Sowohl die Werte für die Silberkorndichte als auch die Daten für den ^3H -Markierungsindex zeigen, daß vielfach selbst hohe CdCl_2 -Konzentrationen nach einer Versuchsdauer von 6 - 7 Stunden die Proliferationsaktivität nicht wesentlich herabgesetzt haben. Allerdings finden sich in den einzelnen Versuchsgruppen Keimlinge, bei denen ein Gewebsverband ($\text{A}_3/8$, $\text{A}_2/9$, $\text{A}_2/10$, $\text{A}_3/11$, $\text{B}_3/11$ und $\text{C}_2/11$) oder auch mehrere ($\text{A}_1/9$ und $\text{A}_3/9$) wesentlich niedrigere Werte für die Silberkorndichte und den ^3H -Markierungsindex aufweisen, als dies bei der Norm (Dreves und Möllers, 1981) bzw. den Keimlingen der 0,63 mg-Gruppe der Fall war.

Bei den am Tage 8 p.c. mit CdCl_2 behandelten Rattenembryonen zeigte ein Keimling der 5 mg-Gruppe ($\text{A}_3/8$) einen wesentlich niedrigeren ^3H -Markierungsindex des Entoderms als die restlichen Keimlinge.

Von den Rattenembryonen, deren Muttertiere am 9. Tag p.c. CdCl_2 erhalten hatten, war der ^3H -Markierungsindex des Neuroektoderms und des Entoderms bei zwei Keimlingen der 5 mg-Gruppe ($\text{A}_1/9$, $\text{A}_3/9$) erheblich niedriger als der der anderen. Bei dem dritten Embryo ($\text{A}_2/9$) fand sich nur bei den Zellen des Entoderms ein niedrigerer ^3H -Markierungsindex. Insgesamt zeigten also bei der 5 mg-Gruppe die Kerne des Entoderms eine erhebliche Abnahme des ^3H -Markierungsindex gegenüber einer weniger deutlichen Abnahme des ^3H -Markierungsindex bei der 2,5 mg-Gruppe und etwa gleichem ^3H -Markierungsindex in den 1,25 mg- und 0,63 mg-Gruppen.

Unter allen am 10. Tag p.c. mit CdCl_2 behandelten Keimlingen fand sich lediglich ein Keimling der 5 mg-Gruppe ($\text{A}_2/10$) mit einem deutlich niedrigeren ^3H -Markierungsindex des extraembryonalen Entoderms, als ihn die anderen Keimlinge aufwiesen.

Bei den am Tage 11 p.c. mit CdCl_2 behandelten Embryonen wies

ein Keimling der 2,5 mg-Gruppe ($B_3/11$) eine wesentlich niedrigere ^3H -Markierungsrate des Neuralrohres auf als alle anderen. Die Darmanlagen je eines Keimlings der 5 mg-Gruppe ($A_3/11$) und der 1,25 mg-Gruppe ($C_2/11$) waren geringer ^3H -markiert als die anderen Keimlinge.

Um sichere Aussagen, d.h. statistisch signifikante Angaben über eine Dosisabhängigkeit der eingetretenen Schäden der Rattenkeimlinge nach i.p. Gabe von CdCl_2 zu erhalten, wären große Versuchsgruppen pro Dosis und Termin erforderlich gewesen, also Versuche, wie sie Ishizu et al. in ihrer 1973 erschienenen Arbeit "An experimental study on teratogenic effect of cadmium" beschrieben haben. Die Autoren verabfolgten weiblichen Mäusen am 7. Trächtigkeitstag eine einmalige subcutane Injektion von Cadmiumchlorid. Die Dosen betrugen 5 mg/kg (Gruppe A), 2,5 mg/kg (Gruppe B), 0,63 mg/kg (Gruppe C) und 0,33 mg/kg Körpergewicht (Gruppe D); der Kontrollgruppe wurde statt Cadmiumchlorid physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Gruppen bestanden aus je 20 Mäusen (Tabelle 4). Am 18. Trächtigkeitstag wurden die Muttertiere getötet und folgende Untersuchungskriterien protokollarisch festgehalten:

1. Lage im Uterus, 2. Geschlecht, 3. Anzahl der mazerierten Feten, Rückbildung der Plazenta und Nidationsstelle (Einnistungsstelle der Keimlinge in der Uterusschleimhaut), 4. äußere Fehl- bzw. Mißbildungen (Kopfbereich mit Gesicht und Mundhöhle, Rückenbereich, vorderer Körperbereich, Schwanz, Gliedmaßen und Zehen), 5. Skelettmißbildungen. Um die Skelettmißbildungen zu erfassen, wurden die Feten mit Alizarin gefärbt. Aborte bzw. das Fehlen von Feten wurden bei acht von zwanzig Tieren der Gruppe A beobachtet, bei zwei der Muttertiere der Gruppe B, bei drei der zwanzig Muttertiere der Gruppe C und bei zwei der Muttertiere der Gruppe D. Bei den zwanzig Muttertieren der Kontrollgruppe wurden keine Aborte oder fehlende Früchte beobachtet. Als trächtige Muttertiere wurden nur diejenigen Mäuse angesehen, die nachweis-

lich gedeckt worden waren und der Tragzeit entsprechend an Gewicht zugenommen hatten. Die weiteren Befunde sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die angegebenen Werte lassen erkennen, daß erstens die Anzahl der Mißbildungen umso größer war, je höher die den Muttertieren verabreichten Dosen waren, und zweitens Mißbildungen dann auftraten, wenn die den Muttertieren verabfolgten Dosen mehr als 0,63 mg/kg Körpergewicht betrugen. Wirbelspalten, Fehlen des Schwanzes und Vaginalatresie wurden nur bei den Feten der Gruppe A gefunden. Im Gegensatz zu den Befunden beim Goldhamster (Ferm/Carpenter, 1968) war die Anzahl der Gaumenspalten außerordentlich gering: Nur bei einem der insgesamt 205 Feten der Gruppe B wurde eine Gaumenspalte beobachtet.

Die meisten Angaben über die Erfassung schädigender Wirkungen von Substanzen auf die Keimlingsentwicklung beruhen auf "Spätbeobachtungen". Dies gilt z.B. nicht nur für die o.g. Angaben von Ishizu et al. (1973), sondern auch für die ausgedehnten Untersuchungen von Birge und Roberts (1976). Diese beiden Autoren untersuchten die Einwirkung verschiedener Schwermetallsalze auf die Entwicklung des Hühnerkeimlings. Sie injizierten die jeweilige Noxe in das Eigelb. Selen, Arsen und Cadmium erwiesen sich als extrem toxisch: Schon bei einer Konzentration von 0,001 ppm betrug die Überlebensrate nur noch 64, 65 bzw. 66 %. Die LD₅₀ lag bei 0,01 bis 0,05 ppm. Blei, Methylquecksilber, Quecksilber und Zink wirkten weniger toxisch: Die Überlebensrate betrug bei einer Konzentration von 0,001 ppm 74, 78, 78 bzw. 83 %. Die LD₅₀ lag bei 1,0 ppm für Blei, Quecksilber und Zink und bei 0,1 bis 0,5 ppm für Methylquecksilber. Die Abnahme der Überlebensrate bzw. die Zunahme der Todesrate bei steigenden Dosen korrelierte mit einer Zunahme der Mißbildungsrate. Die höchsten Dosen, nach deren Verabfolgung noch Hühnchen überlebten, hatten auch die höchste Mißbildungsrate zur Folge. Bei den beobachteten Mißbildungen handelte es sich um Hirndefekte, Anophthalmie, Skelettanomalien und Persistenz des Dottersackes.

Die hier referierten Untersuchungsergebnisse von Ishizu et al. (1973) sowie von Birge und Roberts (1976) sind zwar durch detaillierte Angaben über die Anzahl der geschädigten Mäusefeten am Ende der Trächtigkeit bzw. geschädigten Hühnchen zum Zeitpunkt des Schlüpfens gekennzeichnet. Über die Schädigungsmechanismen, die zum Absterben der Keimlinge oder zu Mißbildungen führten, sagen sie jedoch nichts aus.

Bei den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich hingegen um "Kurzbeobachtungen" - die Rattenembryonen wurden 7 Stunden nach der Cadmiumapplikation getötet -. Wie bereits aufgeführt, zeigten die Rattenembryonen $A_3/8$, $A_2/9$, $A_2/10$, $A_3/11$, $B_3/11$ und $C_2/11$ eine deutliche Abnahme der Proliferationsaktivität im Bereich eines Gewebsverbandes, die Rattenembryonen $A_1/9$ und $A_3/9$ eine deutliche Reduzierung der Proliferationsrate in zwei Gewebsverbänden. Dies ist möglicherweise ein Indiz dafür, daß die Zellen der betroffenen embryonalen Gewebsverbände direkt oder indirekt durch die $CdCl_2$ -Injektion der trächtigen Tiere in ihrer Proliferationsleistung beeinträchtigt worden waren. Wie aber bereits hervorgehoben worden ist, ist die Zahl der untersuchten Embryonen zu gering, um eine bindende Aussage machen zu können. Daß eine Einschränkung der Proliferationsaktivität von embryonalen Gewebsverbänden nach Applikation von Cd erfolgen kann, zeigen die autoradiographischen Untersuchungen von Liu (1981) an Leber- und Uretergewebe von Hühnerkeimlingen: Nach Verabfolgung einer einmaligen Gabe von $CdCl_2$ in die Luftkammer trat eine dosisabhängige Reduzierung der Mitoserate sowie des 3H -Markierungsindex auf. Wie Liu weiter zeigen konnte, enthielten Hühnerkeimlinge, die nach Gabe von 0,1 ppm $CdCl_2$ in die Luftkammer abgestorben waren, wesentlich höhere Cadmiumkonzentrationen als die überlebenden Embryonen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß in diesem Fall das applizierte Cd den Keimling direkt geschädigt hatte. Unter der Voraussetzung, daß auch die in dieser Studie beobachtete Abnahme der Proliferationsaktivität einzelner embryonaler Gewebsverbände auf der $CdCl_2$ -Gabe

beruhe und nicht nur lediglich auf biologischen Schwankungen, könnte man eine direkte Zellschädigung durch Cd diskutieren. Wie Abbildung 3 zeigt, kann eine aus dem Uterusbereich kommende Noxe den Rattenkeimling ohne "Zwischenschaltung" durch embryonale Gefäße nach Passage der lichtmikroskopisch "unvollständigen" Schicht riesenkernhaltiger Trophoblastzellen sowie der Reichertschen Membran mit aufgelagerter "unvollständiger" Zellschicht des parietalen extraembryonalen Entoderms schädigen, indem sie in den Dottersack gelangt und von dort direkt das intra- und extraembryonale Entoderm erreicht. Von hier aus kann das schädigende Agens zu dem daruntergelegenen Ektoderm (Tage 7 und 8 p.c.) bzw. zunächst zum Mesoderm und dann zum Neuroektoderm gelangen.

Es ist daher durchaus möglich, daß die starke Reduzierung der Einbaurate von ^3H -Thymidin in die Zellen der Gewebsverbände der Embryonen $A_3/8$ (Entoderm), $A_1/9$, $A_3/9$ (Ektoderm plus Entoderm), $A_2/9$ (Entoderm), $A_2/10$ (extraembryonales Entoderm), $B_3/11$ (Neuralrohr) und $A_3/11$, $C_2/11$ (Darmanlage) auf eine direkte Einwirkung von Cd zurückzuführen ist.

Allerdings wären indirekte Cadmiumwirkungen nicht auszuschließen. Wie Baumann (1980) in noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen nachweisen konnte, wird bei 3 bis 4 Tage alten Hühnerkeimlingen, denen vor der Bebrütung CdCl_2 in den Dottersack appliziert worden war, als erstes das extraembryonale Gefäßsystem geschädigt. Die Zirkulation bricht zusammen, während das Herz noch schlägt: Die Gefäße sind teils blutleer, teils sind sie von Hämorrhagien umgeben. Auch bei Rattenkeimlingen könnte eine primäre Schädigung des "vorgeschalteten" mütterlichen Kreislaufes, in diesem Fall des Uteruskreislaufes, zu einer zusätzlichen "sekundären" Schädigung des Keimlings führen. Das legen jedenfalls die Untersuchungsbefunde von Copius Peereboom-Stegemann und Jongstra-Spaapen (1979) nahe, die bei Ratten nach einmaliger Applikation von CdCl_2 (0,5 mg/100 g KG) Schäden des microvasculären Systems

des Uterus fanden.

Zukünftige Untersuchungen des Uteruskreislaufs und Konzentrationsbestimmungen von Cd in den Keimlingen, vor allem aber größere Keimlingszahlen pro Versuchsgruppe, sollten hier weitere Indizien über einen schädigenden Effekt von Cd liefern.

Wie Walber (1979) ausführt, spielen bei der Entstehung von Mißbildungen möglicherweise Störungen der Interaktionen zwischen den entstehenden embryonalen Gewebsverbänden eine noch größere Rolle als Störungen der Proliferationsaktivität. Für eine solche Ansicht spricht vor allem die entscheidende Rolle von "Organisatoren" bei der Keimlingsentwicklung: Undeterminierte Gewebsverbände werden durch benachbarte, (bereits determinierte,) als Organisatoren wirkende Gewebsverbände determiniert. Für eine solche Ansicht spricht aber auch die ganz unterschiedliche Proliferationsaktivität einander entsprechender embryonaler Gewebsverbände bei verschiedenen Species mit sehr unterschiedlicher Dauer der Gravidität. Trotz der sehr verschiedenen Proliferationsaktivität der betreffenden Gewebsverbände reagieren diese mitunter sehr ähnlich auf eine einwirkende Noxe.

Der Versuch, eine dosisabhängige Abnahme der Proliferationsaktivität der einzelnen embryonalen Gewebsverbände im Rahmen einer Varianzanalyse nachzuweisen, führte zu keinem signifikanten Resultat. Das läßt nicht unbedingt auf fehlende Effekte schließen, doch waren die Stichprobenumfänge zu gering, um eventuell vorhandene Trends gegen die große biologische Variabilität und die ungünstige Struktur des statistischen Modells abzusichern. Die varianzanalytische Untersuchung stellt somit eine gewisse Überziehung der Kapazität der Daten dar.

Es wurden folgende drei Einflußfaktoren in die Prüfung auf signifikante Effekte einbezogen:

- (1) die embryonalen Gewebsverbände, wobei die sich ab 9. bzw. 10. Trächtigkeitstag und später entwickelnden "differenzierteren" Gewebsverbände (wie z.B. Neuroektoderm, intra- und extra-embryonales Entoderm) auf die "ursprünglichen" drei Keimblätter Ektoderm, Entoderm und Mesoderm zurückgeführt bzw. reduziert wurden. Zusätzlich wurde die Reichertsche Membran einbezogen,
- (2) die Trächtigkeitstage 7, 8, 9, 10 und 11,
- (3) die vier Cadmiumdosen unter Einbeziehung der entsprechenden Kontrollen.

Dabei wurden sowohl die einzelnen Trächtigkeitstage als auch die verschiedenen Dosen als Faktoren und nicht als Kovariable betrachtet, weil lineare Abhängigkeiten nicht unbedingt vorausgesetzt werden konnten.

U.a. konnte folgendes gezeigt werden:

Zwischen den Cd-behandelten Keimlingen und den unbehandelten Kontrollkeimlingen ist ein schwacher Unterschied im ^3H -Markierungsindex erkennbar, der jedoch statistisch nicht gesichert werden kann.

Selbst wenn man die embryonalen Gewebsverbände derjenigen Keimlinge, deren Muttertiere der maximalen Cd-Dosis ausgesetzt worden waren, mit denen der Kontrollkeimlinge vergleicht, erhält man keinen signifikanten Effekt für die Cd-Behandlung. Die Abnahme des ^3H -Markierungsindex beträgt im Mittel gegenüber den Kontrollembrionen weniger als 2 % !

Z u s a m m e n f a s s u n g

In der vorliegenden Pilotstudie sollten Indizien für eine schädigende Wirkung von CdCl_2 auf proliferierende Gewebsverbände von 7, 8, 9, 10 und 11 Tage alten Rattenembryonen gewonnen werden. Die untersuchten Rattenembryonen stammen von jeweils vier Muttertieren A, B, C und D, die am 7., 8., 9., 10. bzw. 11. Trächtigkeitstag getötet worden waren.

An den Trächtigkeitstagen 7, 8, 9, 10 und 11 (Versuchsgruppen I, II, III, IV und V) erhielt ein jedes Muttertier entsprechend seinem Gewicht eine einmalige, vorher errechnete Menge CdCl_2 i.p., und zwar jeweils:

- 5 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier A
- 2,5 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier B
- 1,25 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier C
- 0,63 mg CdCl_2 /kg Körpergewicht Muttertier D

6 Stunden danach erhielt jedes Muttertier eine i.p. Gabe von 2 mCi ^3H -Thymidin pro 300 g Körpergewicht ((methyl- ^3H) THYMIDINE, 5,0 Ci/mmol; Amersham Buchler, Braunschweig). 1 Stunde später erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle der trächtigen Muttertiere in tiefer Äthernarkose und die Exstirpation des Uterus. Anschließend wurden die Muttertiere getötet. Die als umschriebene Auftreibungen der Uterushörner imponierenden Embryonen wurden histologisch aufgearbeitet und ausgewertet.

Die Herstellung der Autoradiogramme erfolgte nach dem Dipping-Verfahren mit K_2 -Emulsion (Ilford, England).

Entsprechend dem Differenzierungsgrad an den einzelnen Trächtigkeits- bzw. Embryonaltagen erfolgte die Auswertung von

primärem Ektoderm - Versuchsgruppe I -

durch den Auswerter Gerigk,

primärem Ektoderm und primärem Entoderm - Versuchsgruppe II -
durch den Auswerter Gerigk,

Neuroektoderm und Entoderm - Versuchsgruppe III -
durch den Auswerter Spaether,

Neuroektoderm, Entoderm und Mesoderm - Versuchsgruppe IV -
durch den Auswerter Haverkamp,

Neuralrohr, Somiten und Darmanlage - Versuchsgruppe V -
durch den Auswerter Schönwald.

Als markiert galten dabei Zellkerne, die 5 Silberkörner und mehr aufwiesen.

Zusätzlich wurde der ^3H -Markierungsindex des parietalen Entoderms, das der Reichertschen Membran angelagert ist, an den Embryonaltagen 9, 10 und 11 bestimmt.

Die Werte für den ^3H -Markierungsindex zeigen, daß vielfach selbst hohe CdCl_2 -Konzentrationen nach einer Versuchsdauer von 6 - 7 Stunden die Proliferationsaktivität der einzelnen embryonalen Gewebsverbände nicht wesentlich herabgesetzt haben. Allerdings finden sich in den einzelnen Versuchsgruppen Keimlinge, bei denen ein Gewebsverband ($A_1/8$, $A_2/9$, $A_2/10$, $A_3/11$, $B_3/11$ und $C_2/11$) oder auch mehrere ($A_1/9$ und $A_3/9$) wesentlich niedrigere Werte für die Silberkorndichte und den ^3H -Markierungsindex aufwiesen, als dies bei der Norm (Dreves und Möllers, 1981) bzw. den Keimlingen der 0,63 mg Gruppe der Fall war.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stellen ein mögliches Indiz für eine direkte Beeinflussung der Proliferationsaktivität

der o.g. embryonalen Gewebsverbände durch CdCl_2 dar. Doch dürfen anhand der vorliegenden Resultate noch keine bindenden Schlüsse gezogen werden, da die einzelnen Versuchsgruppen zu klein sind, um eine statistisch signifikante, dosisabhängige Abnahme der Proliferationsaktivität der einzelnen embryonalen Gewebsverbände nachzuweisen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

BALINSKY, B.I. (1970):

An Introduction to Embryology. 3rd ed. - Philadelphia,
London, Toronto: W.B. Saunders Company.

BARR, M. (1973):

The teratogenicity of Cadmium in two stocks of Wistar
rats.
Teratology, 7, 237-242.

BAUMANN, L.:

unveröffentlichte Ergebnisse.

BIRGE, W.J., and O.W. ROBERTS (1976):

Toxicity of metals to chick embryos.
Bull. environm. Contam. Toxicol., 16, 319-324.

CHRISTENSEN, F.C., and E.C. OHLSEN (1957):

Cadmium poisoning.
Arch. industr. Hlth, 16, 8.

COPIUS PEEREBOOM-STEGEMAN, J.H.J. (1980):

persönliche Mitteilung.

COPIUS PEEREBOOM-STEGEMAN, J.H.J., und E.J. JONGSTRA-SPAAPEN
(1979):

The effect of a single sublethal administration of cadmium
chloride on the microcirculation in the uterus of the rat.
Toxicology, 13, 199-213.

CUMBROWSKI, J., und W. RAFFKE (1975):

Cadmium - ein Schadfaktor in der menschlichen Umwelt.
Z. ges. Hyg., 21, 1-7.

DENCKER, L. (1975):

Possible mechanisms of cadmium fetotoxicity in golden hamsters and mice: Uptake by the embryo, placenta and ovary.
J. Reprod. Fertil., 44, 461-471.

DREVES, C., und C. MÖLLERS (1981):

Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferationsaktivität embryonaler Gewebsverbände von Rattenkeimlingen nach i.p. Injektion der Muttertiere mit ^3H -Thymidin.
Inaug.-Diss., Düsseldorf.

EVALUATION of the environmental impact of cadmium. Report prepared by R. Lauwerys. - Luxembourg: Commission of the European Communities (1976).

FERM, V.H. (1969):

The syneratogenic effect of lead and cadmium.
Experientia (Basel), 25, 56-57.

FERM, V.H. (1971):

Developmental malformations induced by cadmium.
Biol. Neonate, 19, 101-107.

FERM, V.H., and S.J. CARPENTER (1967):

Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc.
Nature, 216, 1123.

FERM, V.H., and S.J. CARPENTER (1968):

The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian teratogenesis.
Lab. Invest., 18, 429-432.

FERM, V.H., and D.P. HANLON (1974):

Placental transfer of zinc in the Syrian hamster during early embryogenesis.
J. Reprod. Fertil., 39, 49-52.

FERM, V.H., D.P. HANLON, and J. URBAN (1969):

The permeability of the hamster placenta to radioactive cadmium.

J. Embryol. exp. Morph., 22, 107-113.

FRIBERG, L., et al. (1974):

Cadmium in the environment. With technical and editorial assistance from Pamela Boston. -

Cleveland, Ohio: CRC Press.

GALE, T.F. (1973):

The interaction with cadmium and zinc in mammalian embryonic development.

Environm. Res., 6, 95-105.

GALE, T.F., and V.H. FERM (1973):

Skeletal malformations resulting from cadmium treatment in the hamster.

Biol. Neonate, 23, 149-160.

HAGEMANN, E., und G. SCHMIDT (1960):

Ratte und Maus. Versuchstiere in der Forschung. -

Berlin: de Gruyter.

HENNEBERG, B. (1937):

Normentafel zur Entwicklungsgeschichte der Wanderratte. -

Jena: Fischer. 26 Taf. Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere. 15.

HILSCHER, W., und B. HILSCHER, (1978):

Einflüsse der Umwelt auf die Embryonalentwicklung.

In: Lufthygiene und Silikoseforschung. Hrsg. v.d. Ges.

z. Förderung d. Lufthygiene u. Silikoseforschung e.V.,

Düsseldorf - Essen: Giradet, S. 106-142.

HOLMBERG, R.E., and V.H. FERM (1969):

Interrelationship of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis.

Arch. environm. Hlth, 18, 873-877.

HURLEY, L.S., and H. SWENERTON (1966):

Congenital malformation resulting from zinc deficiency in rats.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 123, 692-696.

ISHIZU, S., et al. (1973):

An experimental study on teratogenic effect of cadmium.

Industr. Hlth (Kawasaki), 11, 127-139.

LIU, W.K. (1981):

Beiträge zur Cadmiumwirkung auf den Hühnerembryo. Histologische, histochemische und autoradiographische Untersuchungen.

Inaug.-Diss., Düsseldorf.

LUCIS, O.J., R. LUCIS, and Z.A. SHAIKH (1972):

Cadmium and zinc in pregnancy and lactation.

Arch. environm. Hlth, 25, 14-22.

MULVIHILL, J.E., S.H. GAMM, and V.H. FERM (1970):

Facial formation in normal and cadmium-treated golden hamsters.

J. Embryol. exp. Morph., 24, 393-403.

NEW, D.A.T. (1966):

The Culture of Vertebrate Embryos.

London, New York: Logos Press, Academic Press.

NORDBERG, G.F. (1974):

Health hazards of environmental cadmium pollution.
Ambio, 3, 55-66.

PARIZEK, J., et al. (1968):

Pregnancy and trace elements: The protective effect of compounds of an essential trace element - selenium - against the peculiar toxic effects of cadmium during pregnancy.
J. Reprod. Fertil., 16, 507-509.

ROSENBAUER, K.A. (1969):

Exogene Mißbildungen.
In: Entwicklung, Wachstum, Mißbildungen und Altern bei Mensch und Tier. Hrsg. v. Karlheinz A. Rosenbauer. - Stuttgart: Wiss. Verl. Ges., S. 99-141.

SNOW, M.H.L. (1976):

Embryo growth during the immediate postimplantation period.
In: Embryogenesis in mammals. - Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier, pp. 53-70.
= Ciba Foundation Symposium 40 (new series).

STARCK, D. (1975):

Embryologie. Ein Lehrbuch auf allgemein biologischer Grundlage.
3. neubearb. u. erw. Aufl. - Stuttgart: Thieme.

TYLER, G. (1972):

Heavy metals pollute nature, may reduce productivity.
Ambio, 1, 52-59.

UMWELTBUNDESAMT:

Unterlagen für die Festlegung eines Grenzwertes für Cadmium.
Luftqualitätskriterien für Cadmium 1977.

WALBER, K. (1979):

Wirkung von Cadmium auf die Embryonalentwicklung von
Wistar-Ratten.

Inaug.-Diss., Düsseldorf.

WOLKOWSKI, R.M. (1974):

Differential cadmium-induced embryotoxicity in two inbred
mouse strains.

Teratology, 10, 243-262.

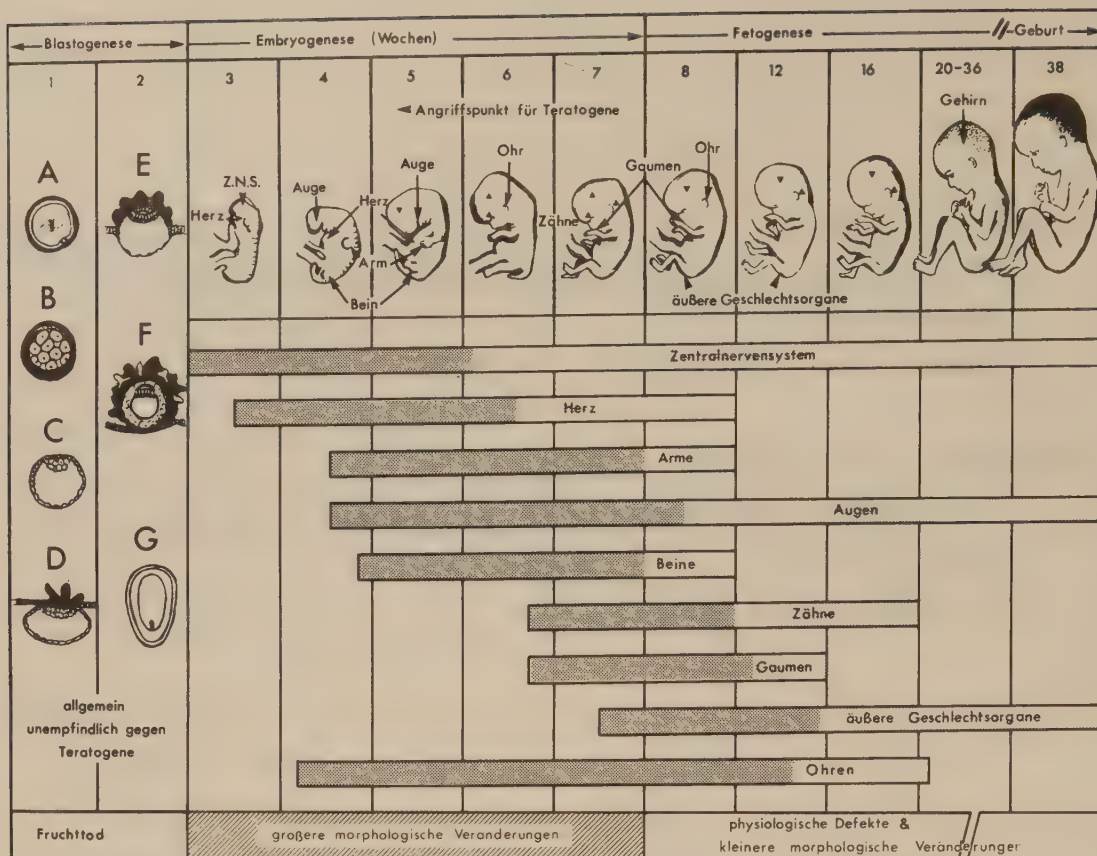


Abb. 1

Schema der Entwicklung des menschlichen Keimlings mit Blastogenese (Spalten 1 und 2), Embryogenese (Spalten 3 bis 7) und Fetogenese (folgende Spalten) modifiziert nach Moore.

Spalte 1 mit A: Zygote, B: Morula, C: Blastozyste mit Trophoblast und Embryoblast vor der Implantation und D: zu Beginn der Implantation.

Spalte 2 mit E: Keimling, bestehend auf Trophoblast und zweischichtiger Keimscheibe während der Implantation, F: nach Bildung der Amnionhöhle sowie des von der Heuserschen Membran umgebenen primären Dottersackes nach Abschluß der Implantation und G: nach beginnender Bildung des Primitivstreifens.

Schädigungen des Keimlings während der Blastogenese werden entweder ausgeglichen oder führen zum Tode der Frucht, Schädigungen während der Embryogenese und zu Beginn der Fetogenese führen zu Mißbildungen oder zum Tode des Keimlings. Mißbildungen des Zentralnervensystems, der Augen und des äußeren Genitale können auch noch während der mittleren und späten Fetogenese entstehen. Die quergerichteten Säulen geben die "kritischen Tage" bzw. Zeitabschnitte an, in denen die Ausbildung der einzelnen Organe und Extremitäten durch umweltbedingte und auch genetisch bedingte Schäden besonders leicht gestört werden kann, wobei der Bereich mit dunkelgrauer Tönung die Periode stärkerer Empfindlichkeit und der Bereich mit hellgrauer Tönung die Periode mit schwächerer Empfindlichkeit gegen umwelt- und anlagebedingte Schadfaktoren darstellen soll.

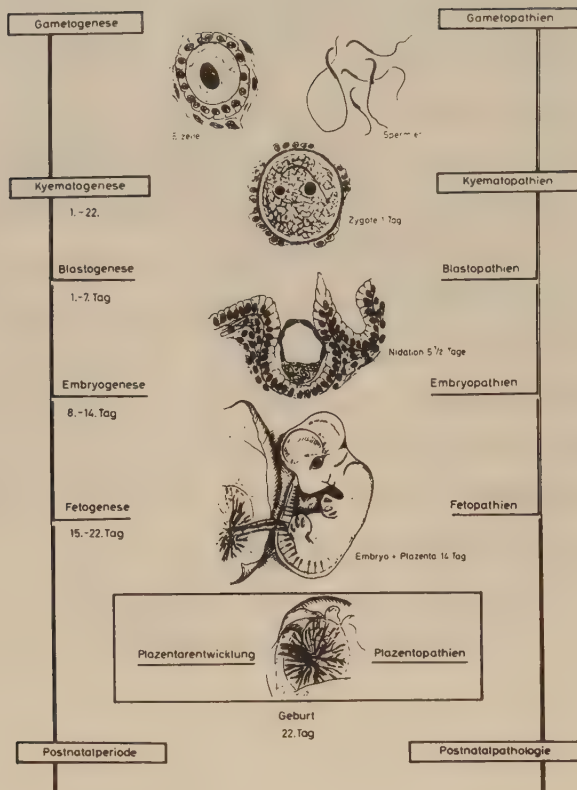


Abb. 2

Entwicklungsstadien der vorgeburtlichen Entwicklung bei der Ratte. Terminologie der normalen und pathologischen Entwicklung.

Aus ROSENBAUER (1969): Exogene Mißbildungen.

In: Entwicklung, Wachstum, Mißbildungen und Altern bei Mensch und Tier.

Primitiventwicklung der Ratte

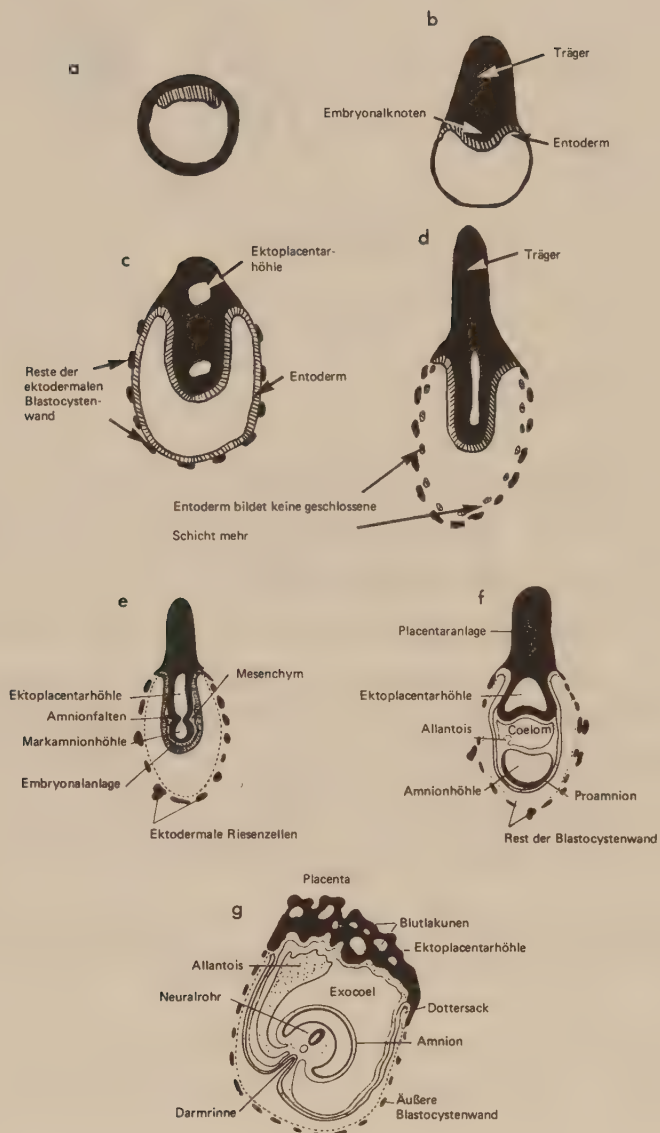


Abb. 3

Orientierendes Schema über die Entwicklungsabläufe des Rattenkeimlings an den Tagen 7 - 11 p.c.

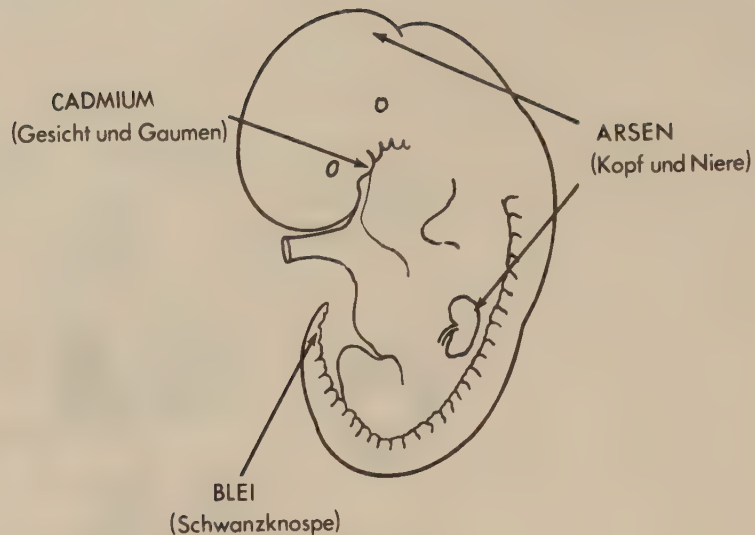


Abb. 4

Die Wirkung von Cadmium, Arsen und Blei (Gabe am 8. Gestationstag) auf die Pränatalentwicklung des Goldhamsters.

Cadmium schädigt vor allem den Gesichtsschädel- und Gaumenbereich, Blei den Bereich der Schwanzknospe, Arsen vor allem den Bereich des Kopfes und des Urogenitalsystems. Im Gegensatz zum Goldhamster werden bei der Maus nach Cadmium-einwirkung so gut wie keine Veränderungen im Gesichtsschädel- und Gaumenbereich hervorgerufen. Schema modifiziert nach Ferm (1972).

Abb. 5

Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen verschiedener embryonaler Gewebsverbände 7 - 14 Tage alter ungeschädigter Rattenkeimlinge nach i.p. Injektion der Muttertiere mit ^3H -Thymidin eine Stunde vor der Tötung. Angegeben sind die Mittelwerte und die

Einzelwerte des ^3H -Markierungsindex von je 2 Embryonen pro Termin

durch die Auswerter Möllers und Dreves (1981). Als markiert angesehen wurden alle Zellen mit 5 und mehr Silberkörnern.

Ch. Dreves und Christine Möllers (1981):

Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferationsaktivität embryonaler Gewebsverbände von Rattenkeimlingen nach i.p.

Injektion

der Muttertiere mit ^3H -Thymidin.

Inaug.-Diss., Düsseldorf.

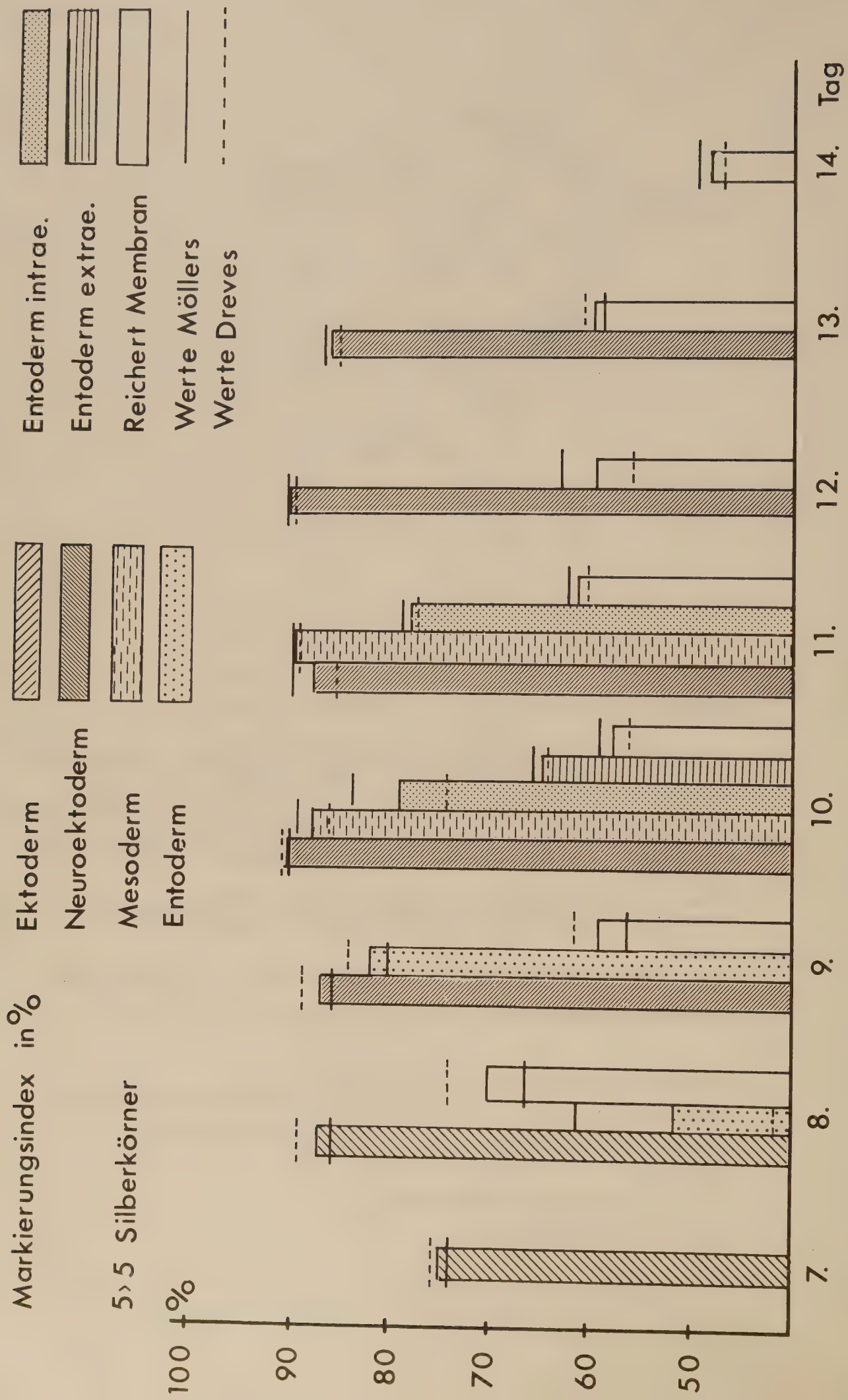


Abb. 5

Abbildungen 6 - 20

Die Abbildungen 6 - 20 zeigen die graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse, zusam-

mengefaßt in drei Kollektive (0 - 4 Silberkörner/Kern, 5 - 9 Silberkörner/Kern und 10 und mehr Silberkörner/Kern) in Abhängigkeit von der applizierten CdCl_2 -Dosis. Jede Einzelsäule repräsentiert einen Embryonen pro Versuchsgruppe und Termin.

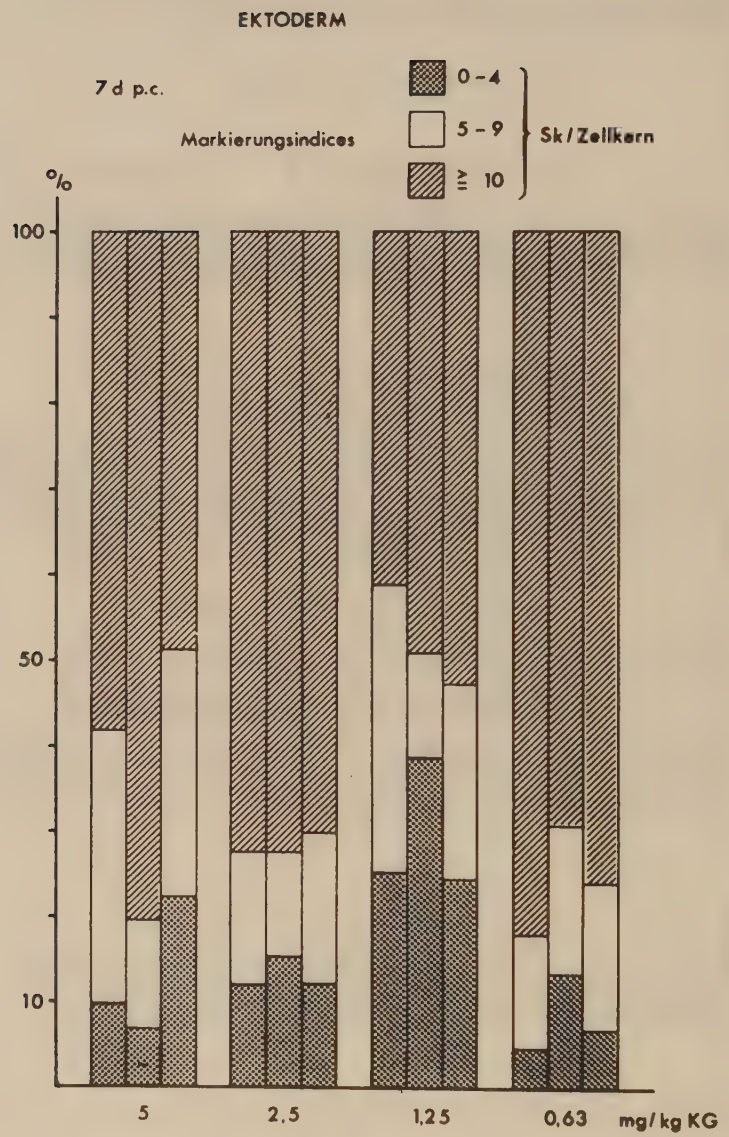


Abb. 6

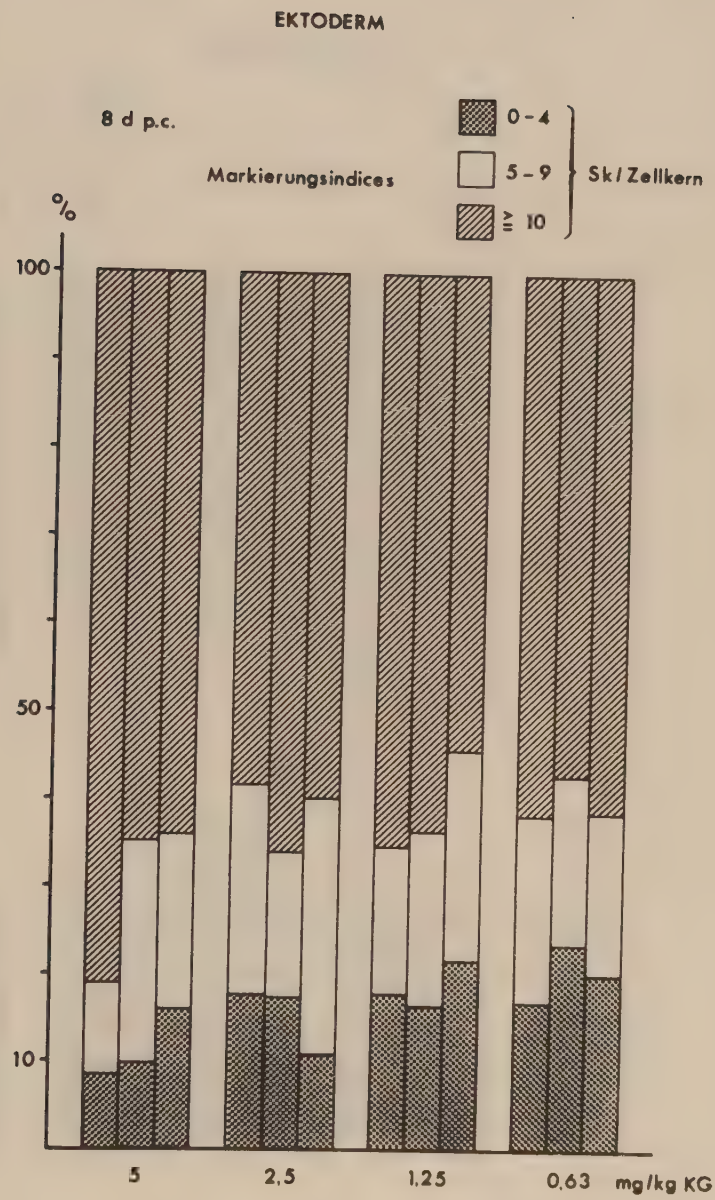


Abb. 7

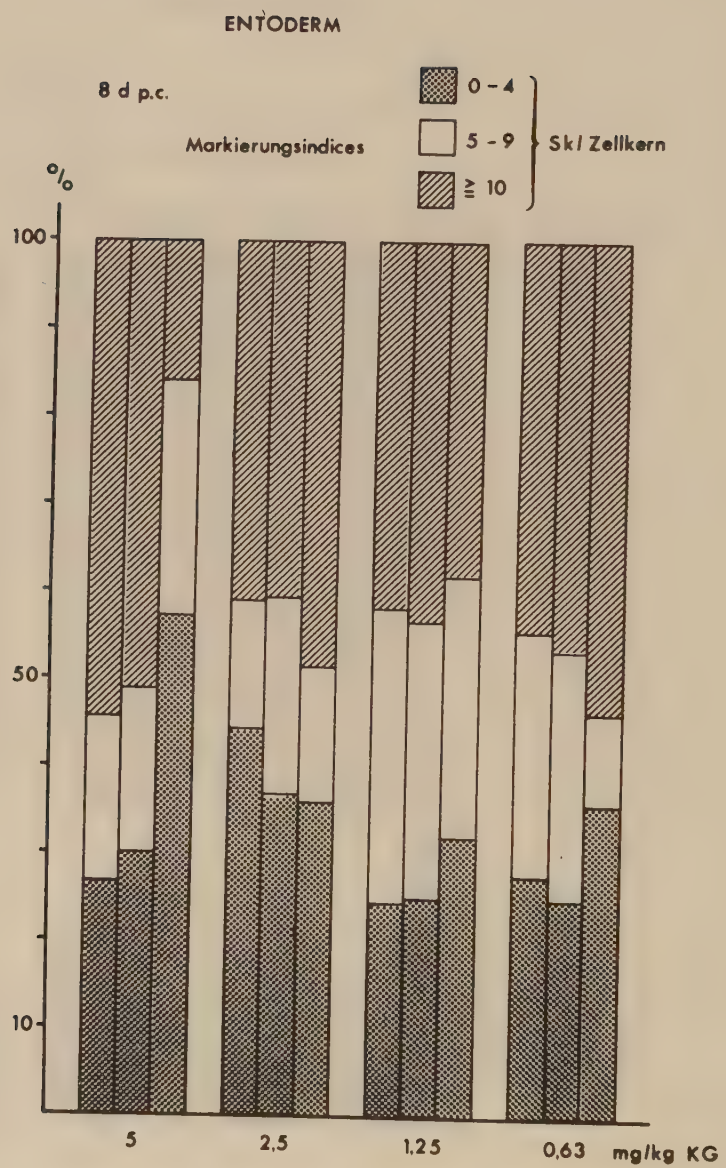


Abb. 8

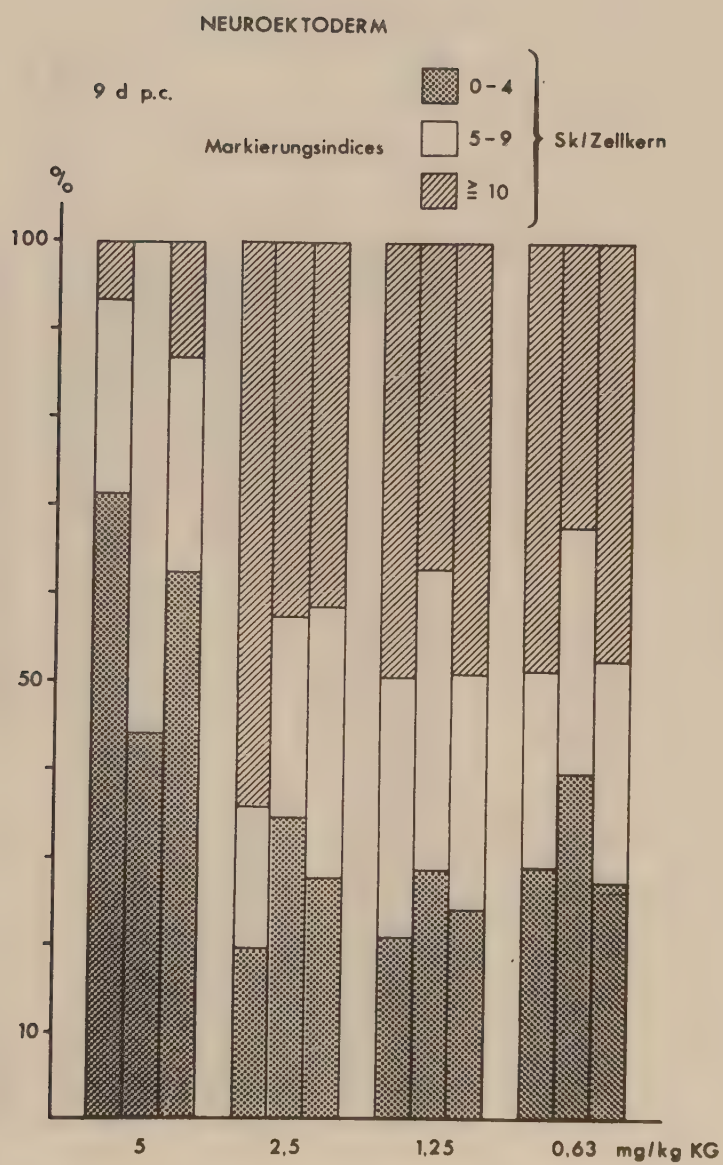


Abb. 9

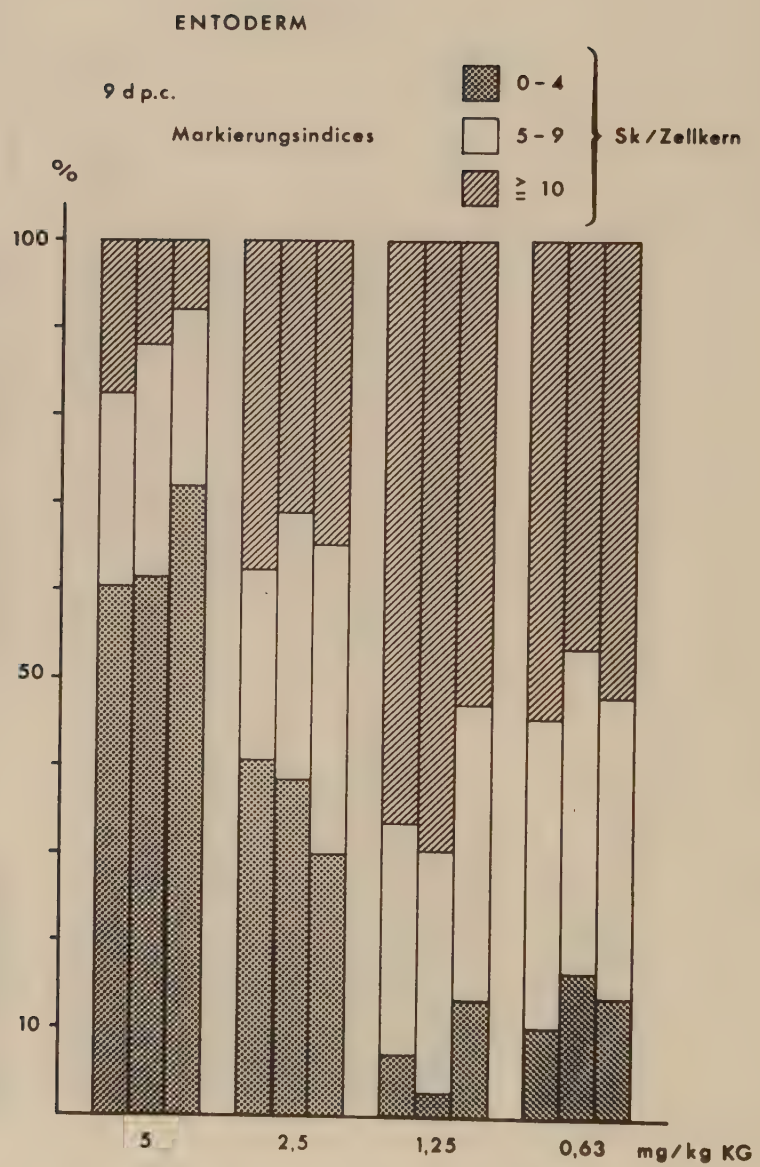


Abb. 10

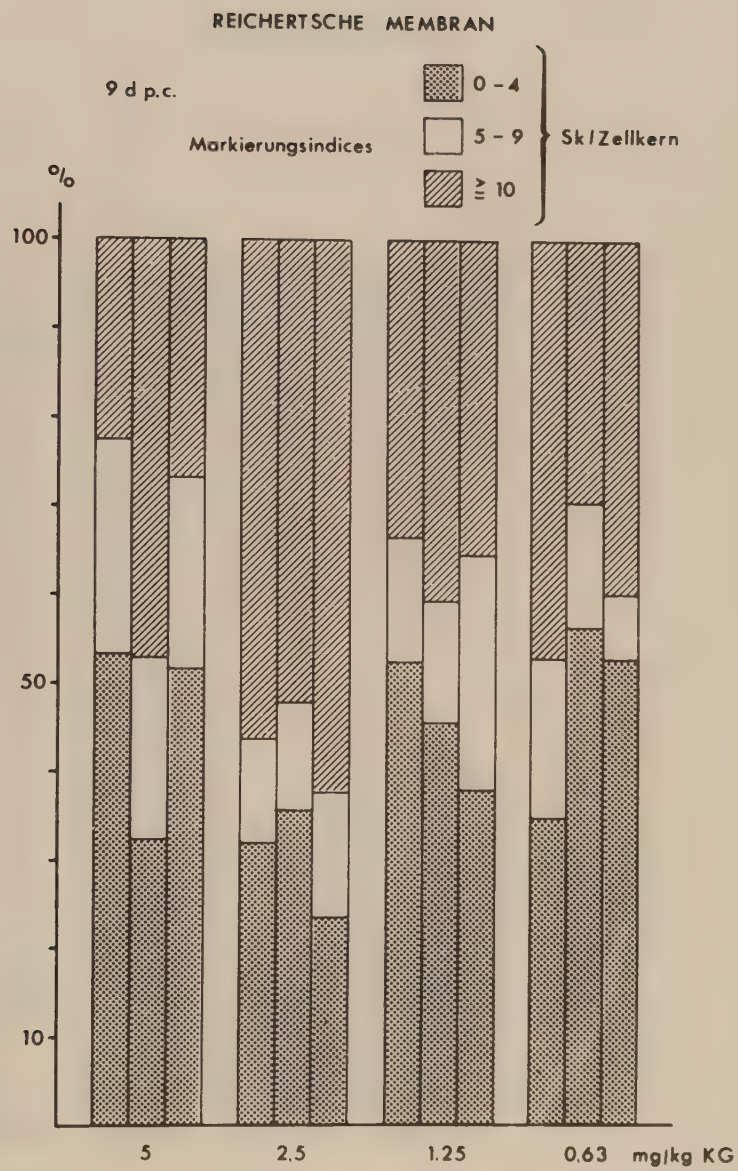


Abb. 11

NEUROEKTODERM

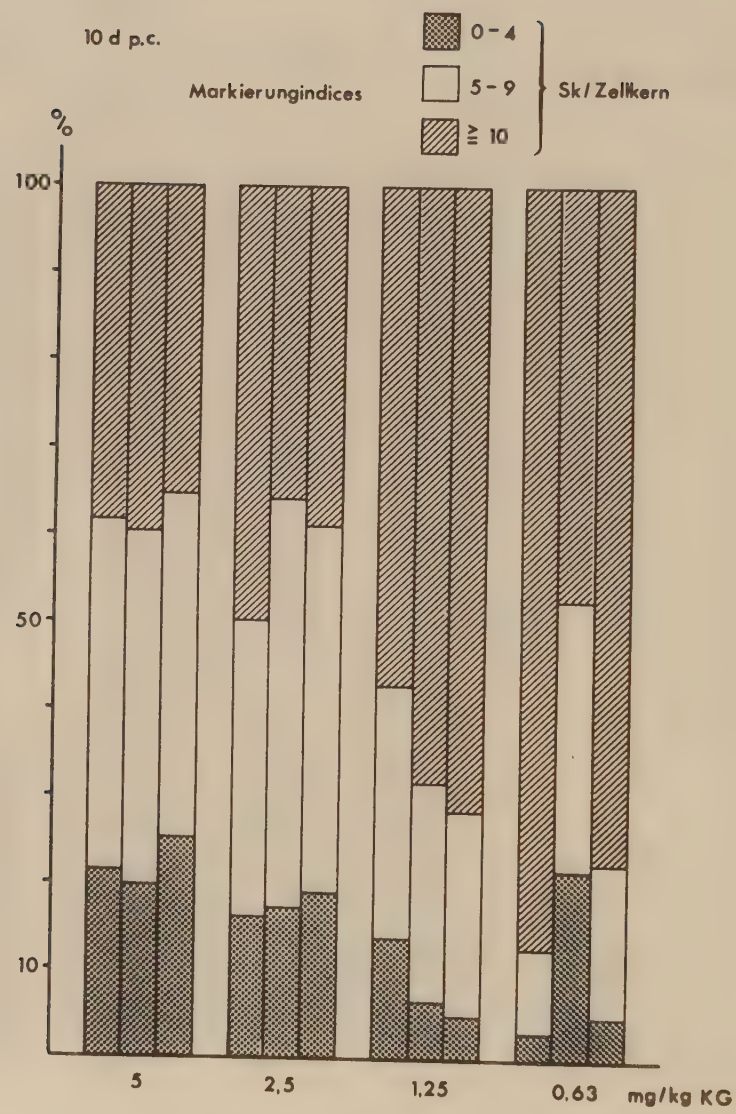


Abb. 12

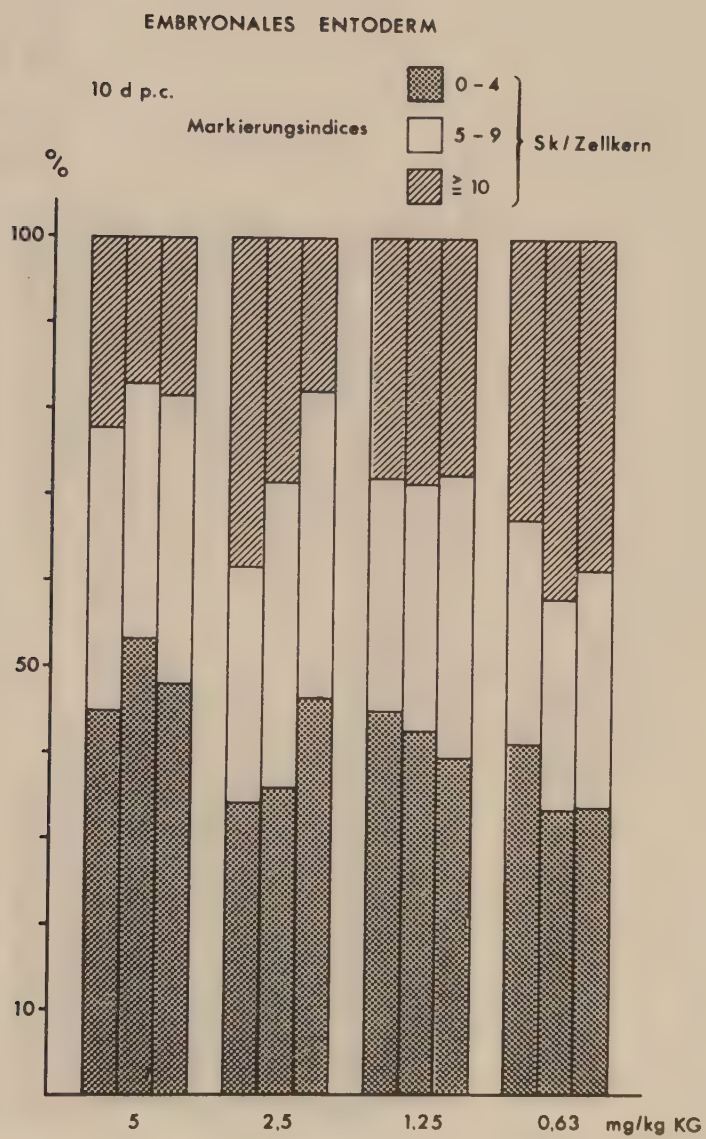


Abb. 13

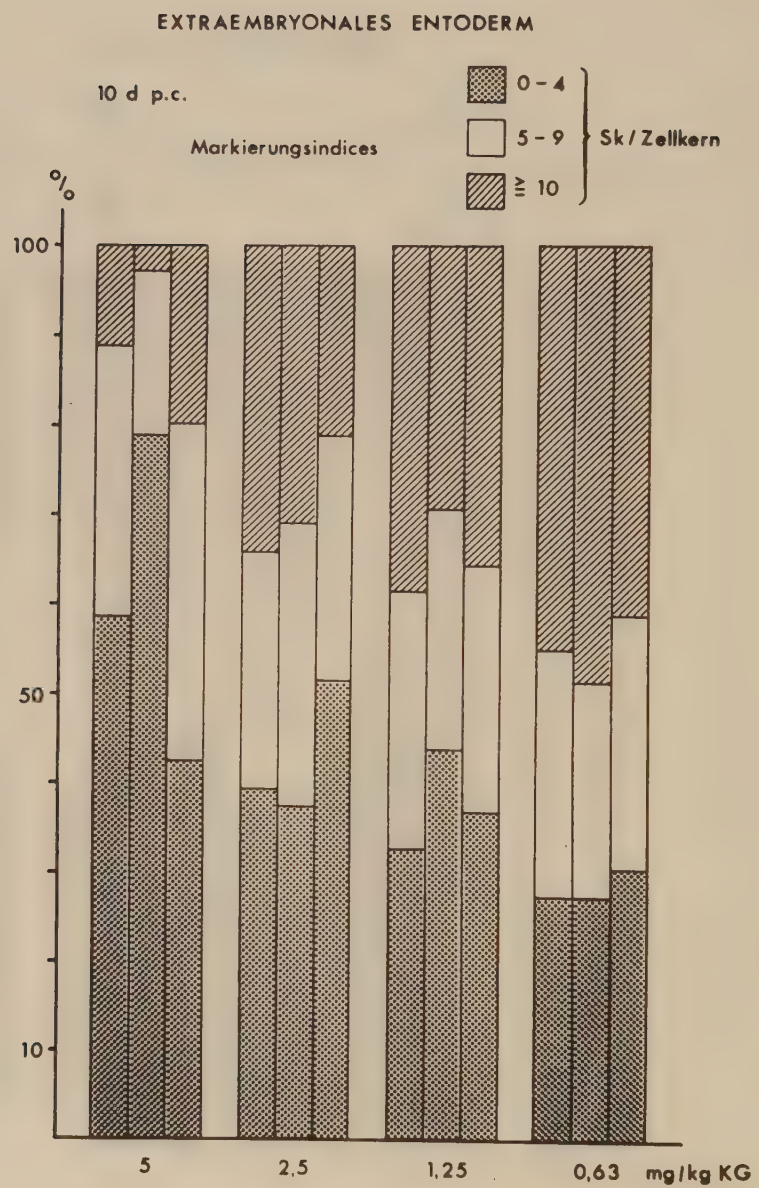


Abb. 14

REICHERTSCHES MEMBRAN

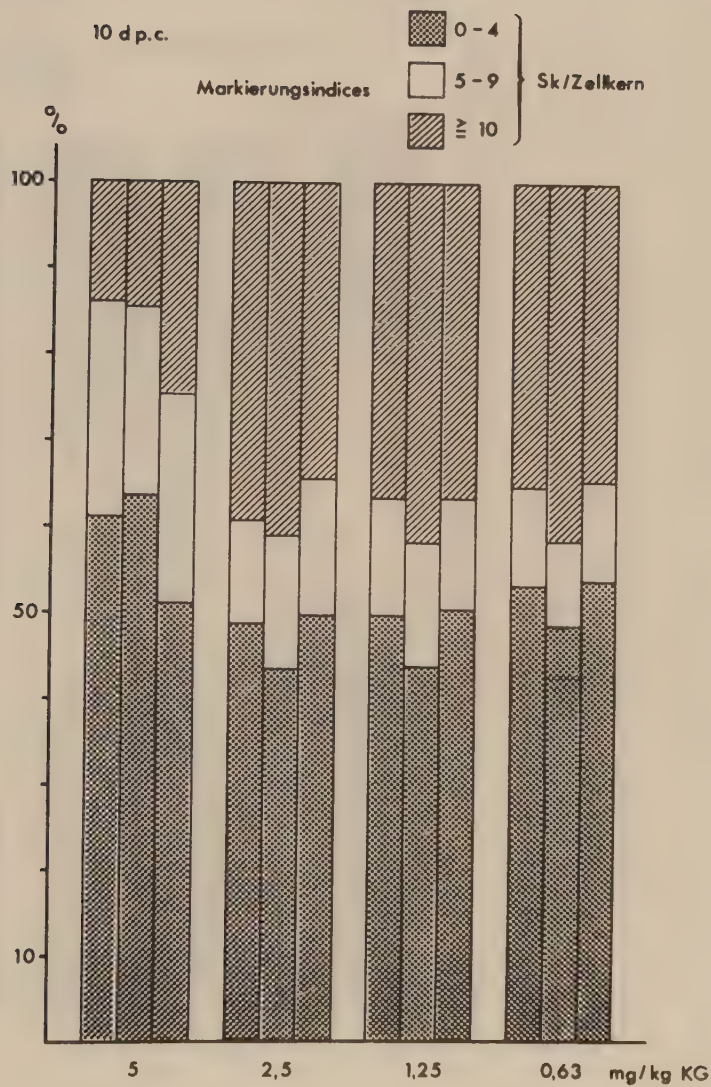


Abb. 15

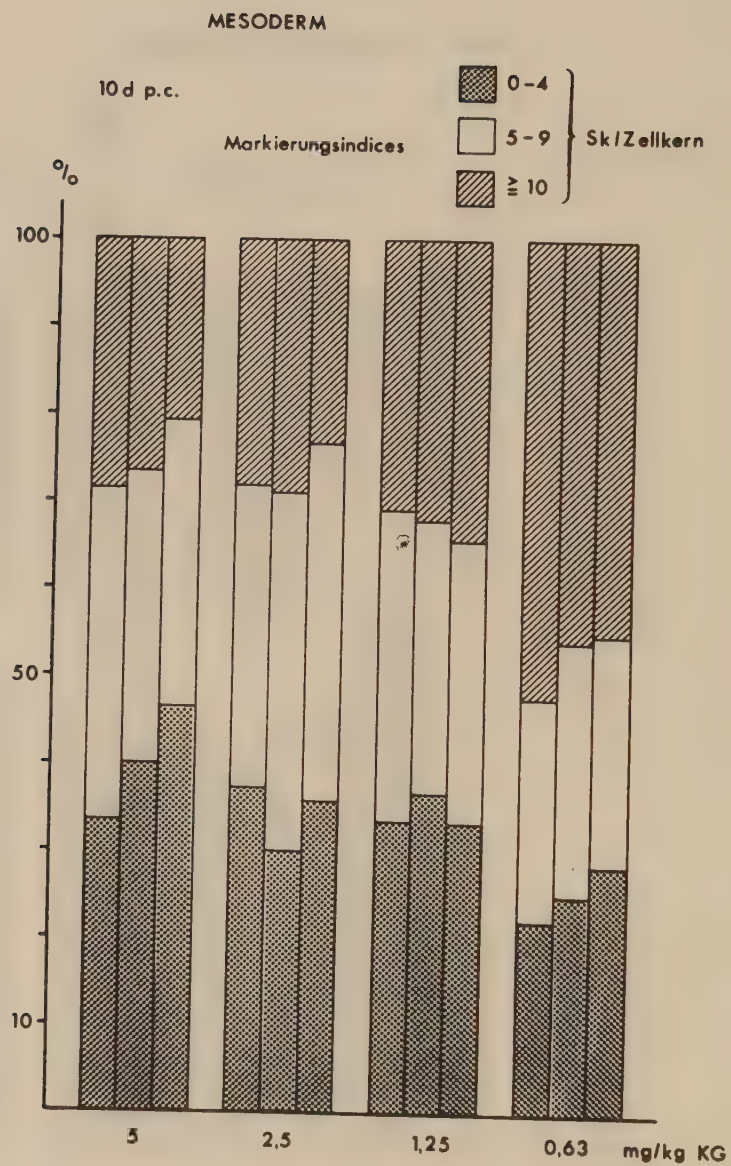


Abb. 16

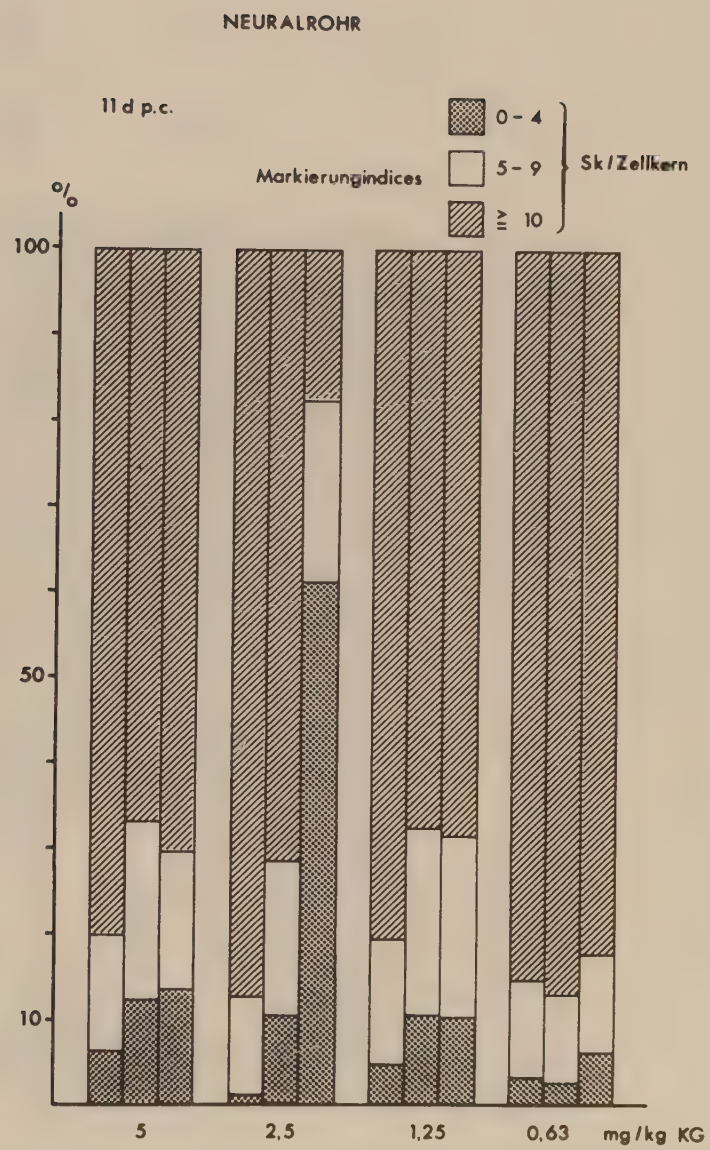


Abb. 17

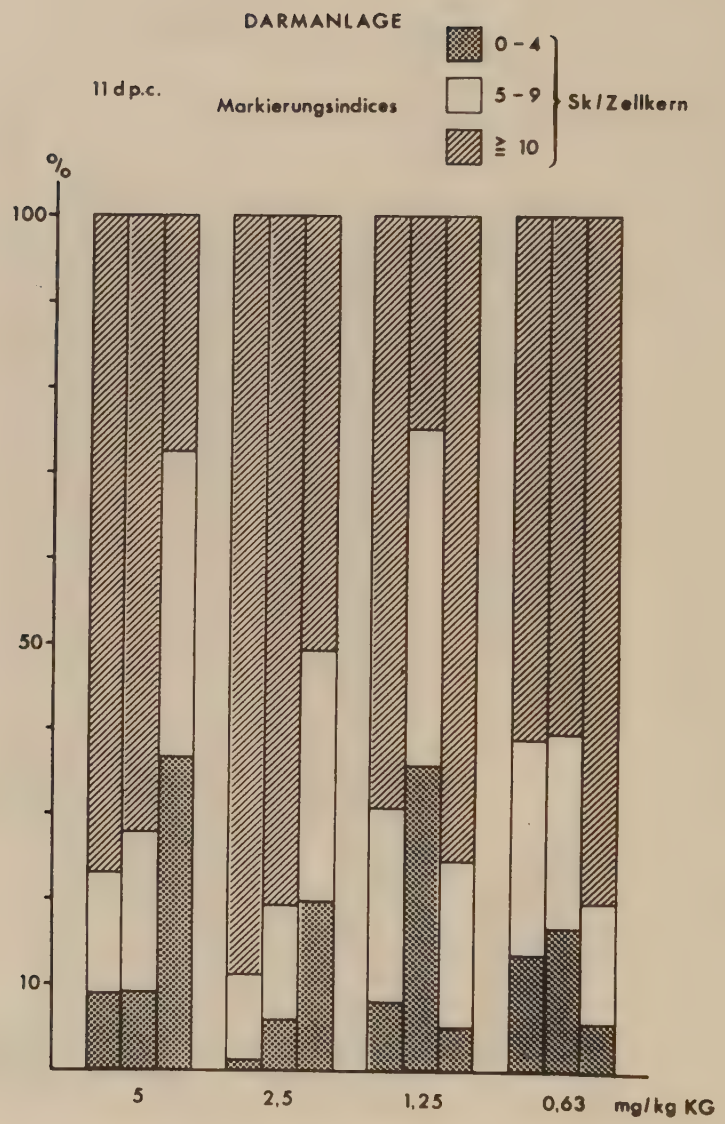


Abb. 18

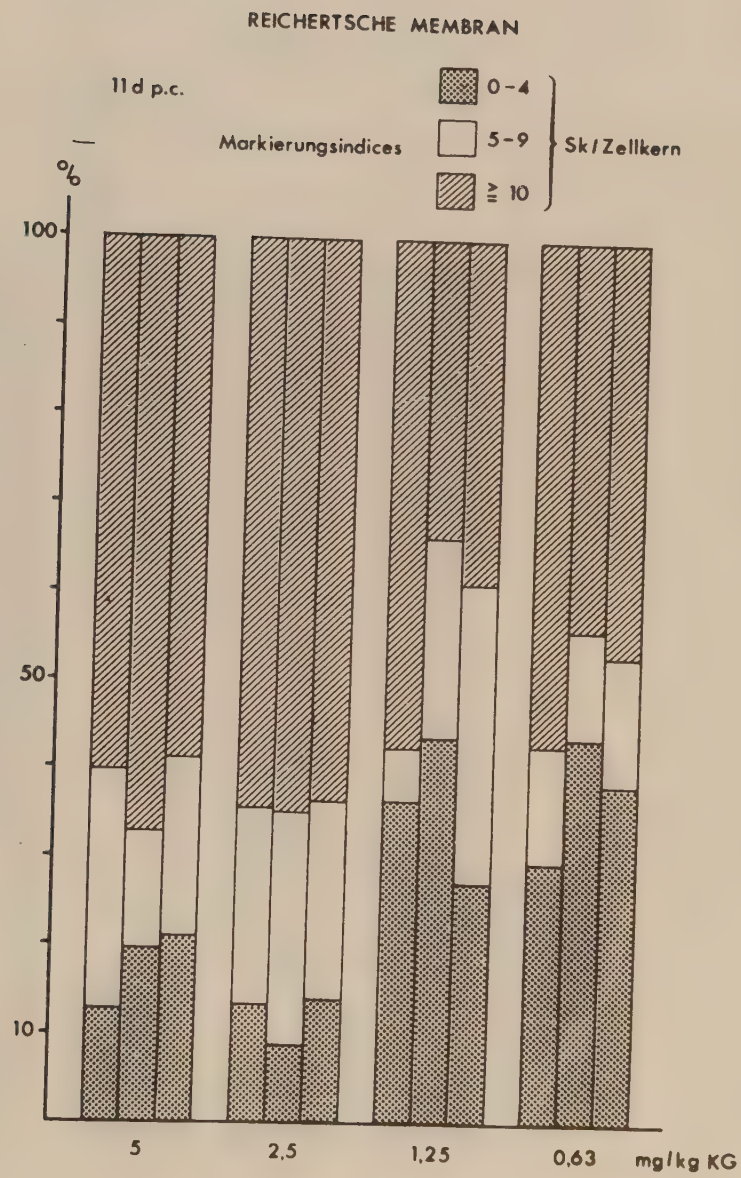


Abb. 19

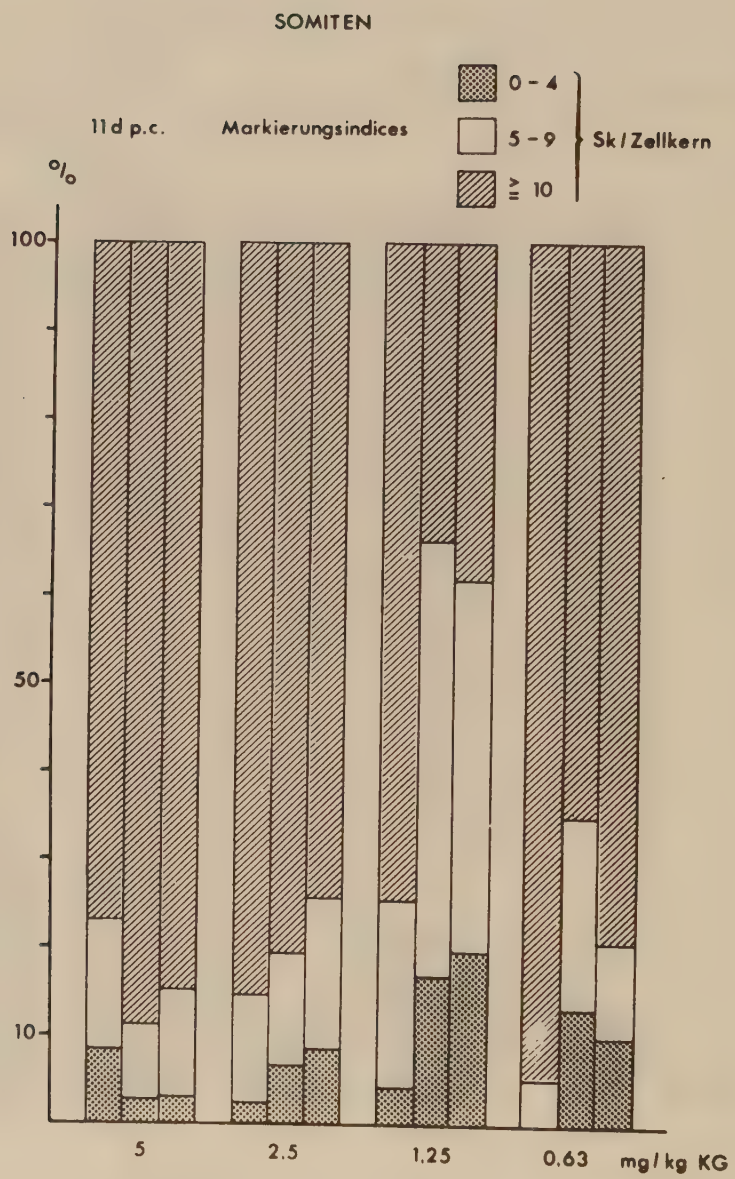


Abb. 20

Abbildungen 21 - 24

Die Abbildungen 21 - 24 zeigen die vergleichende Darstellung der Untersuchungsergebnisse, zusammengefaßt in drei Kollektive (0 - 4 Silberkörner/Kern, 5 - 9 Silberkörner/Kern und 10 und mehr Silberkörner/Kern) für die einzelnen Gewebsverbände an den verschiedenen Trächtigkeitstagen in Abhängigkeit von der applizierten CdCl_2 -Dosis. Jede Einzelsäule repräsentiert den Mittelwert der Auswertungsergebnisse von jeweils drei Embryonen, d.h. einer Versuchsgruppe.

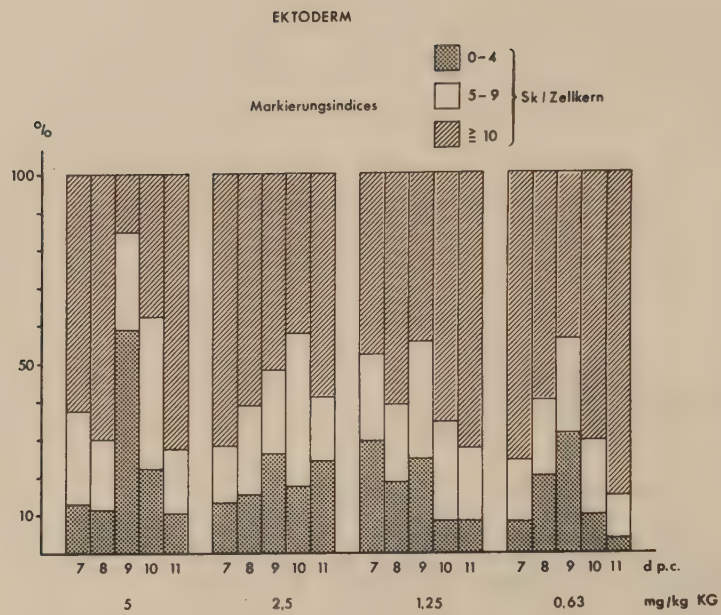


Abb. 21

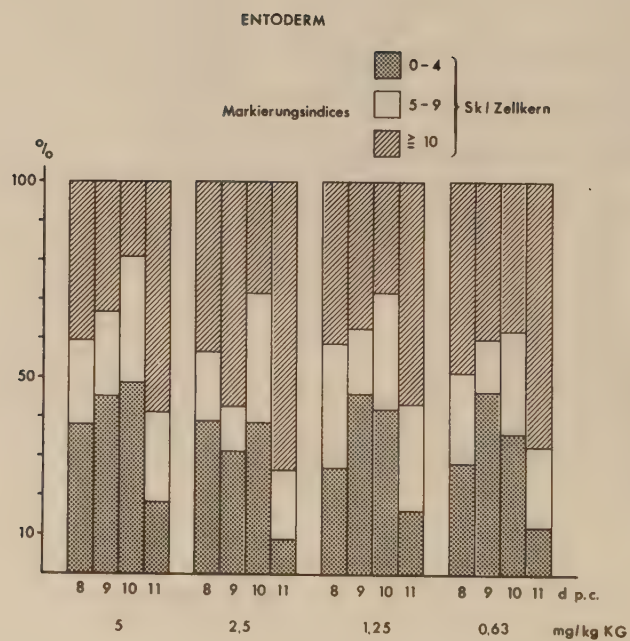


Abb. 22

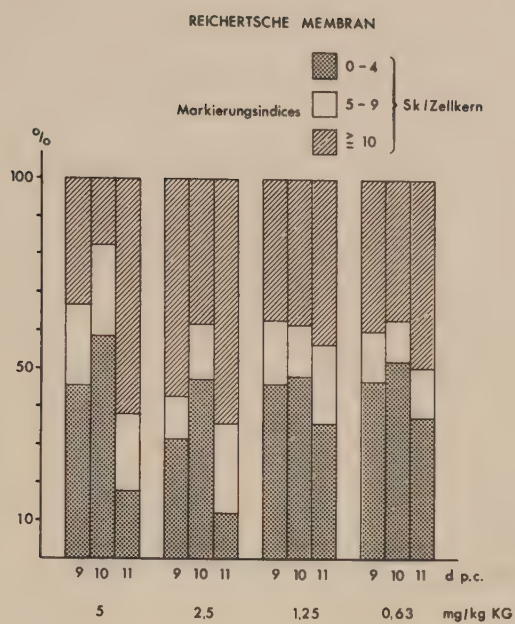


Abb. 23

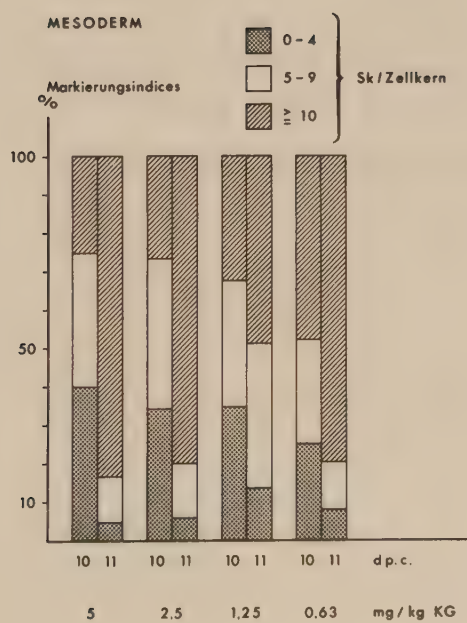


Abb. 24

Abbildungen 25 - 39

Die Abbildungen 25 - 39 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der ^3H -Markierungsindices in Abhängigkeit von der verabfolgten CdCl_2 -Dosis.

Jede Säule stellt den Mittelwert dreier untersuchter Embryonen, d.h. einer Versuchsgruppe, dar; der ^3H -Markierungsindex ergibt sich aus dem Anteil der mit 5 und mehr Silberkörnern markierten Zellkerne.

EKTODERM

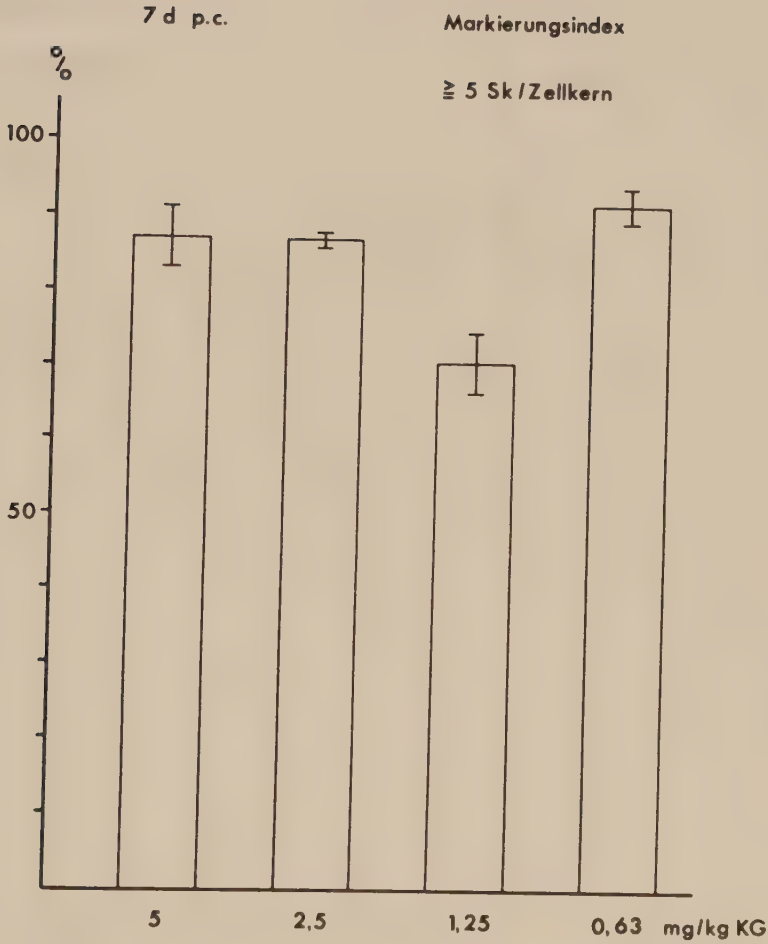


Abb. 25

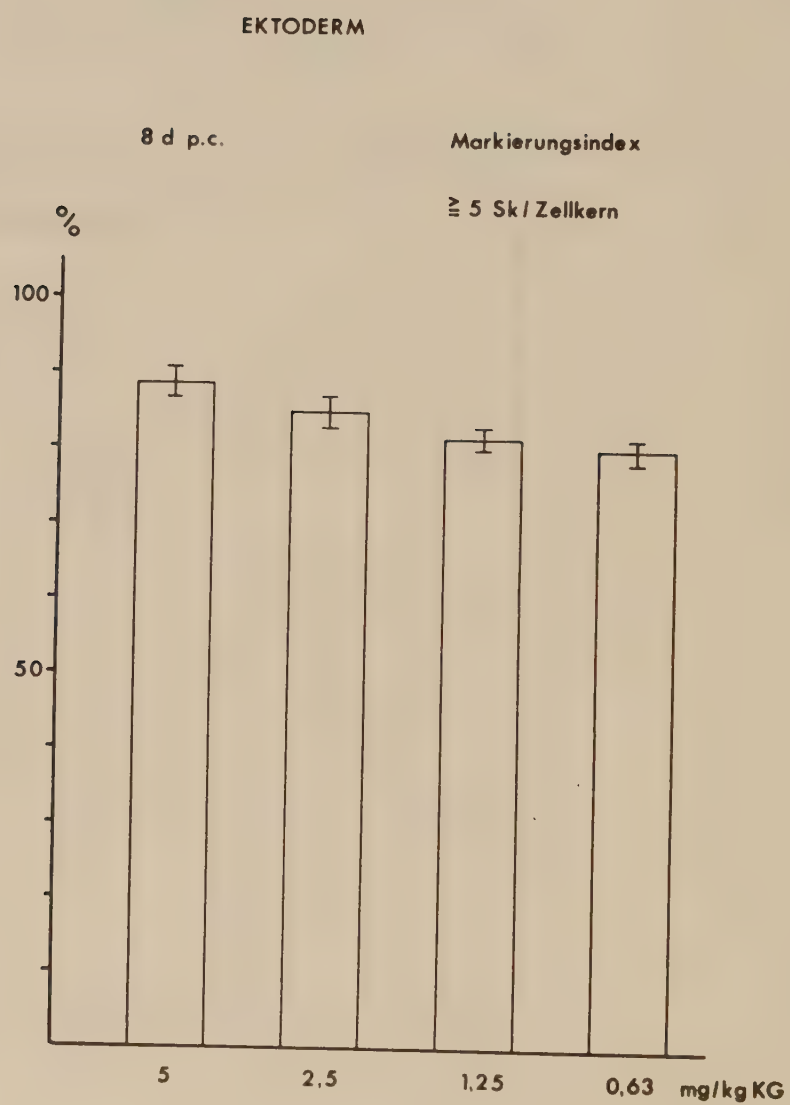


Abb.26

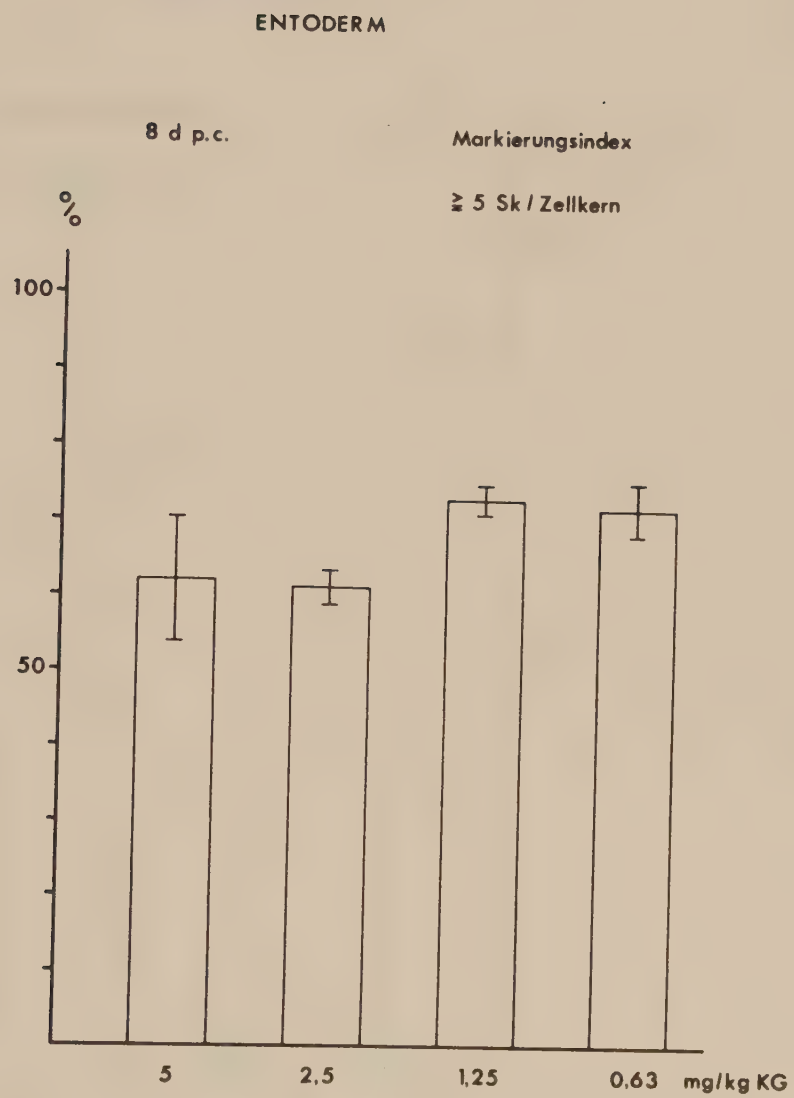


Abb. 27

NEUROEKTODERM

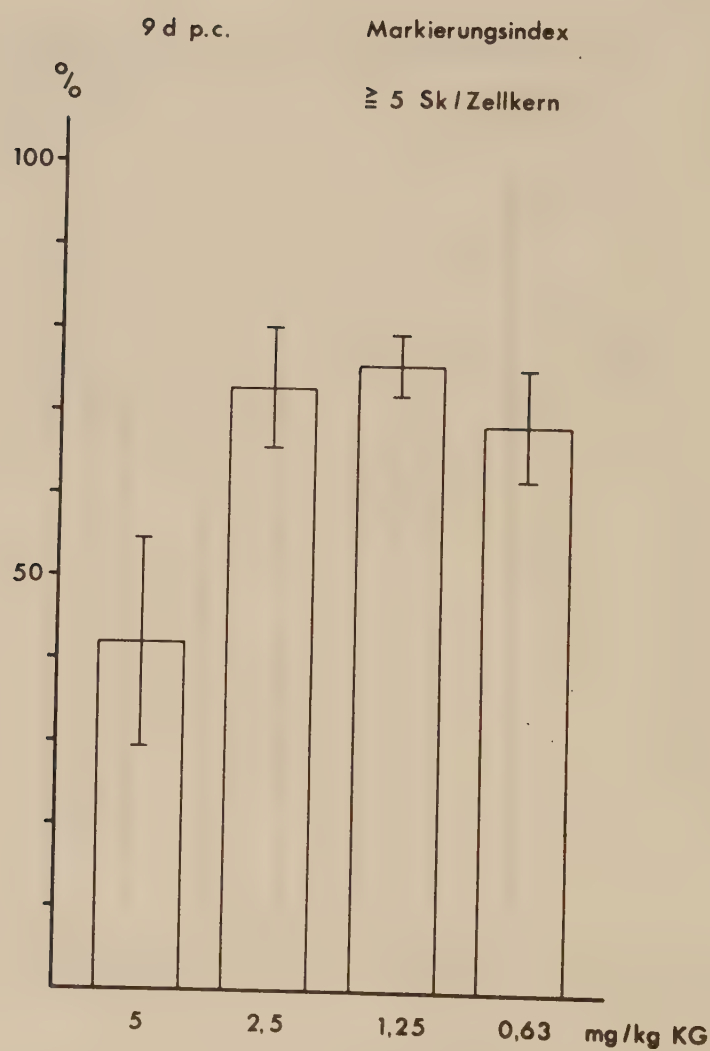


Abb. 28

ENTODERM

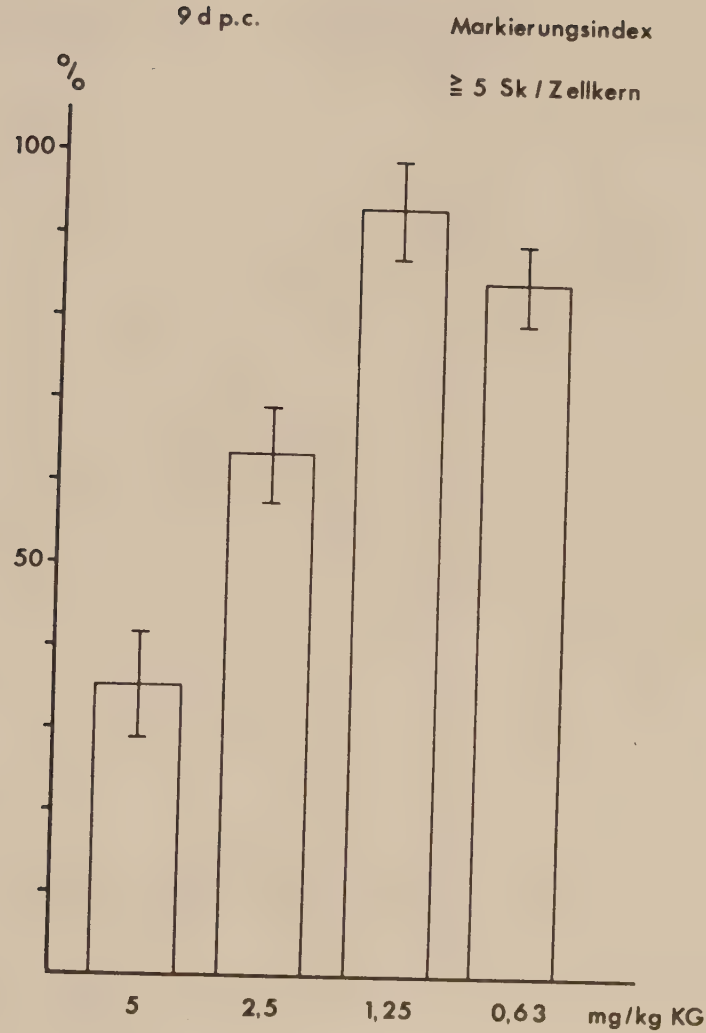


Abb. 29

REICHERTSCHES MEMBRAN

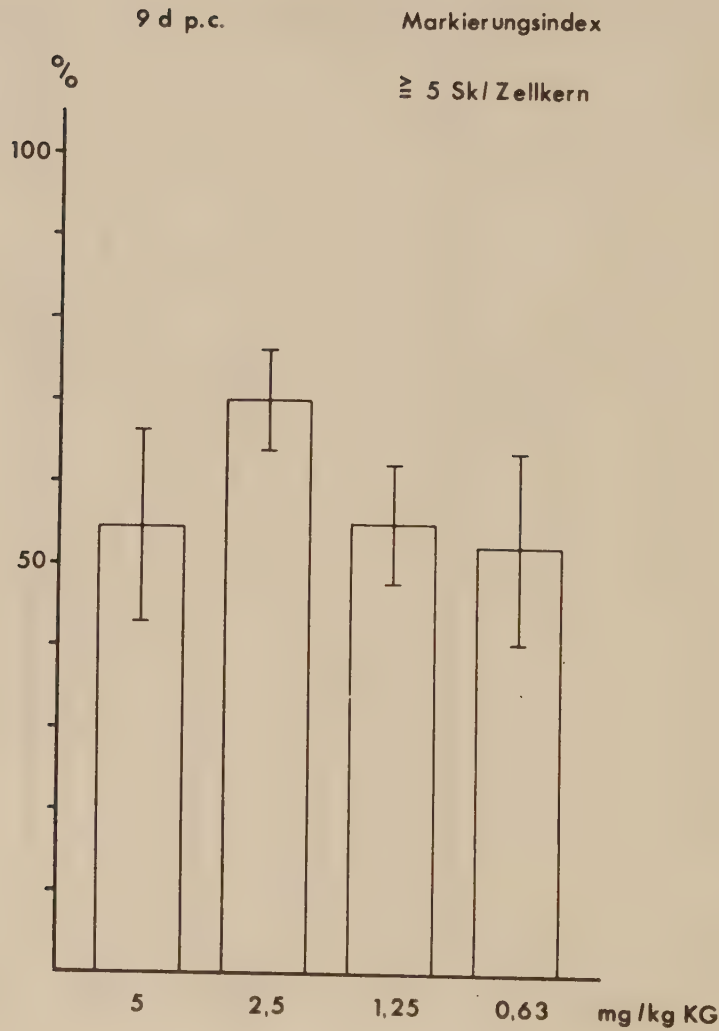


Abb. 30

NEUROEKTODERM

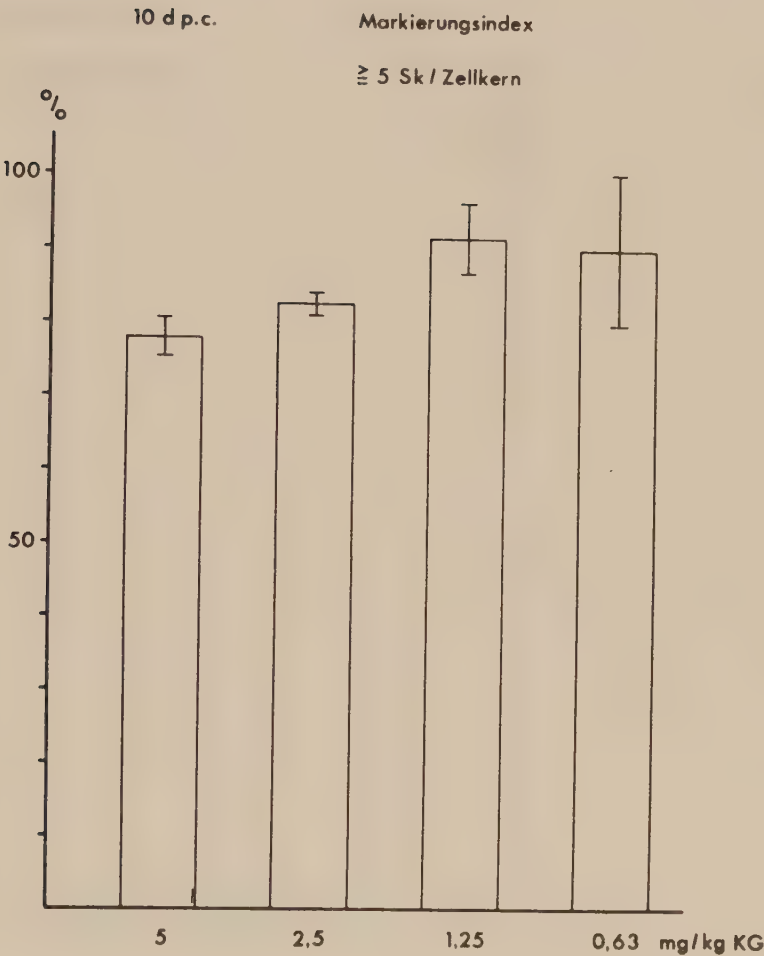


Abb. 31

EMBRYONALES ENTODERM

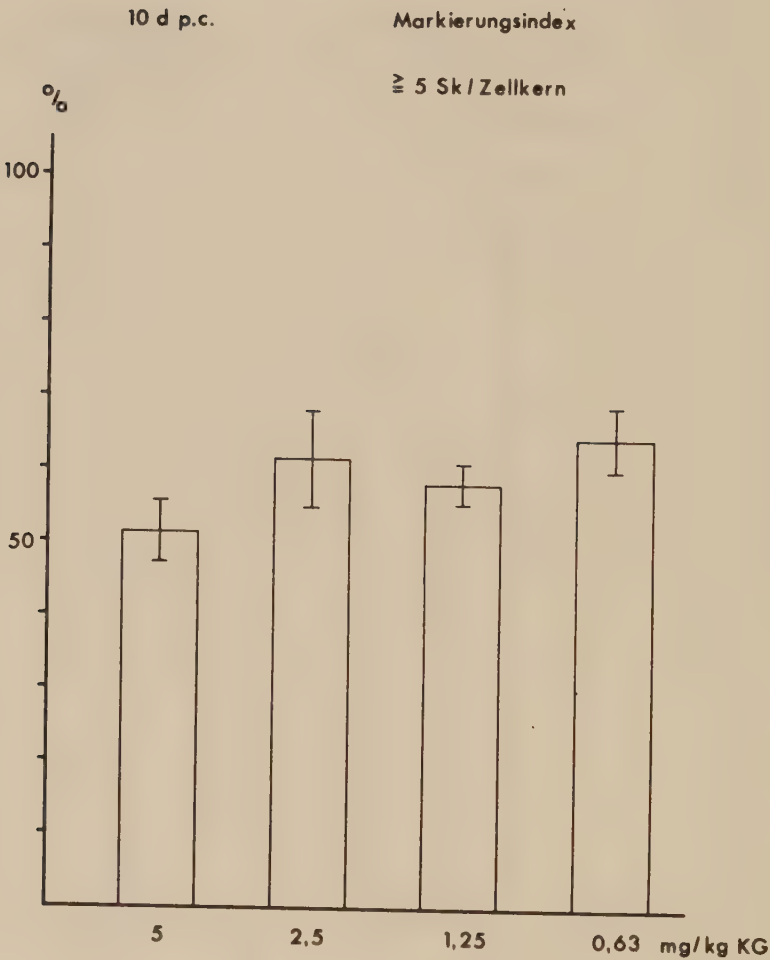


Abb. 32

EXTRAEMBRYONALES ENTODERM

10 d p.c.

Markierungsindex

≥ 5 Sk / Zellkern

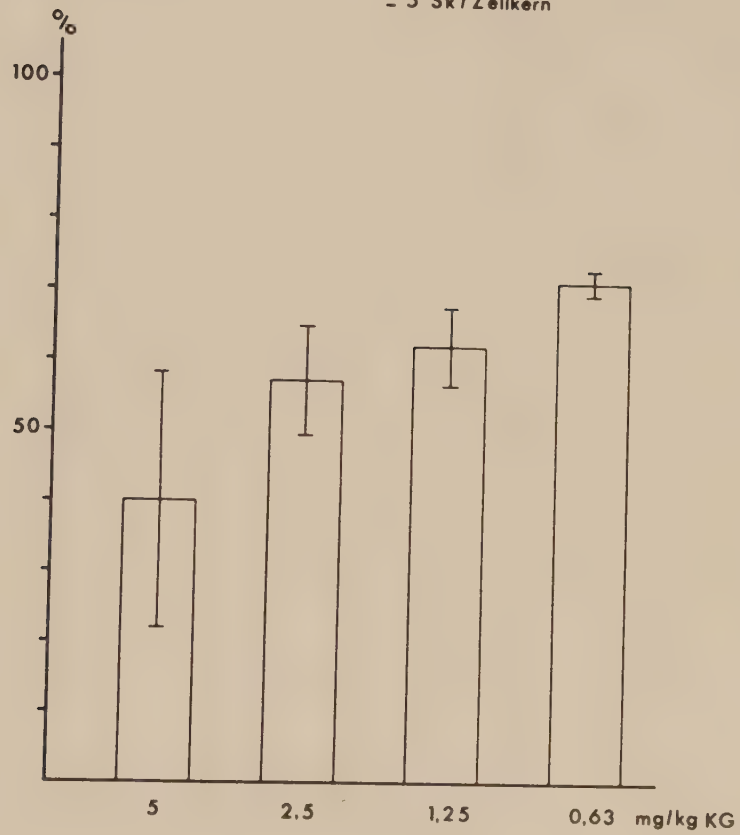


Abb. 33

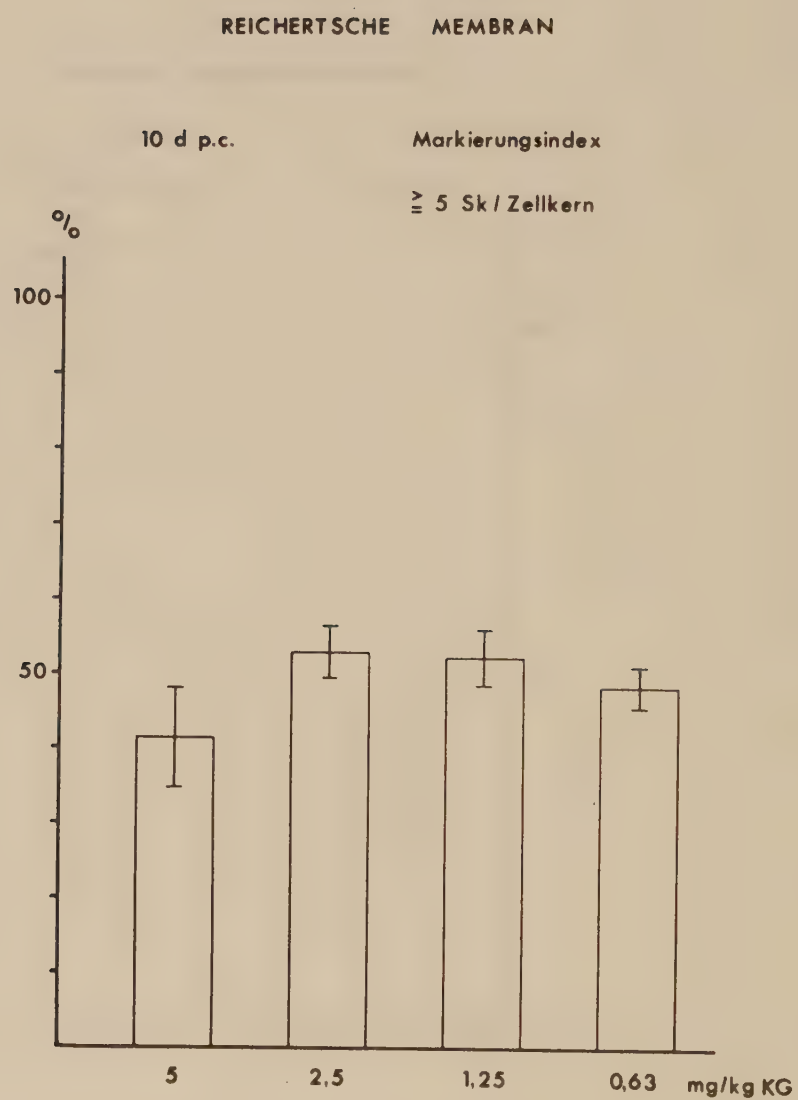


Abb. 34

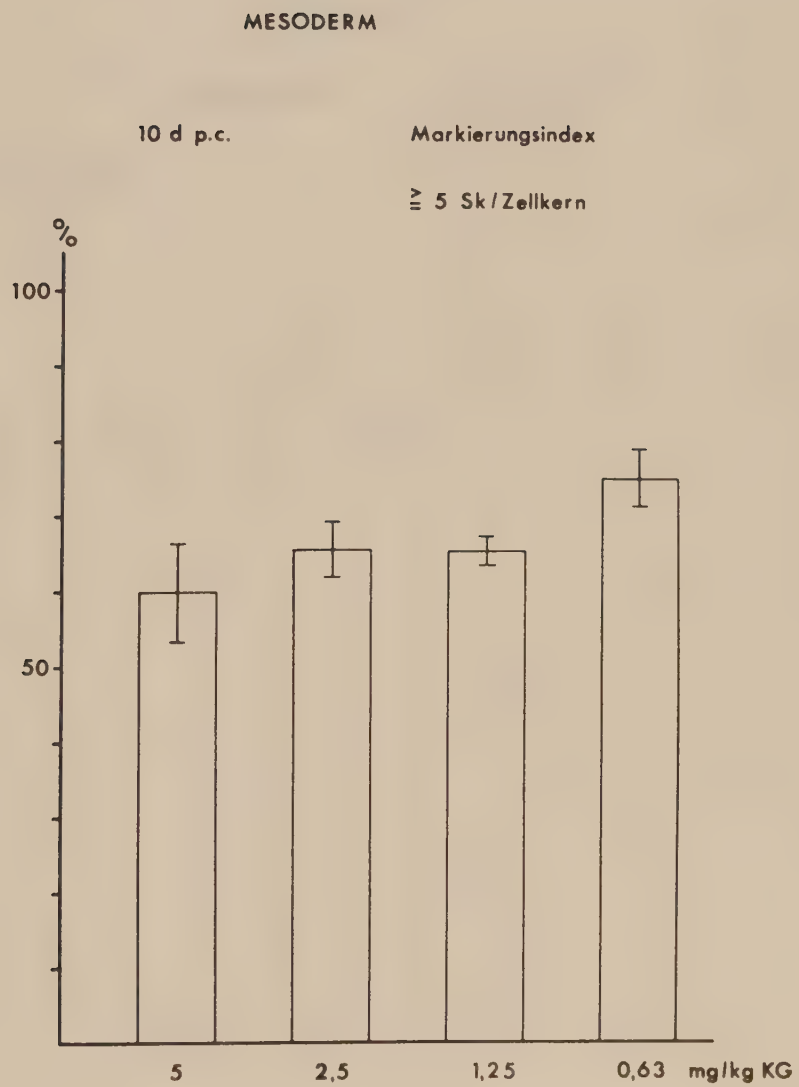


Abb. 35

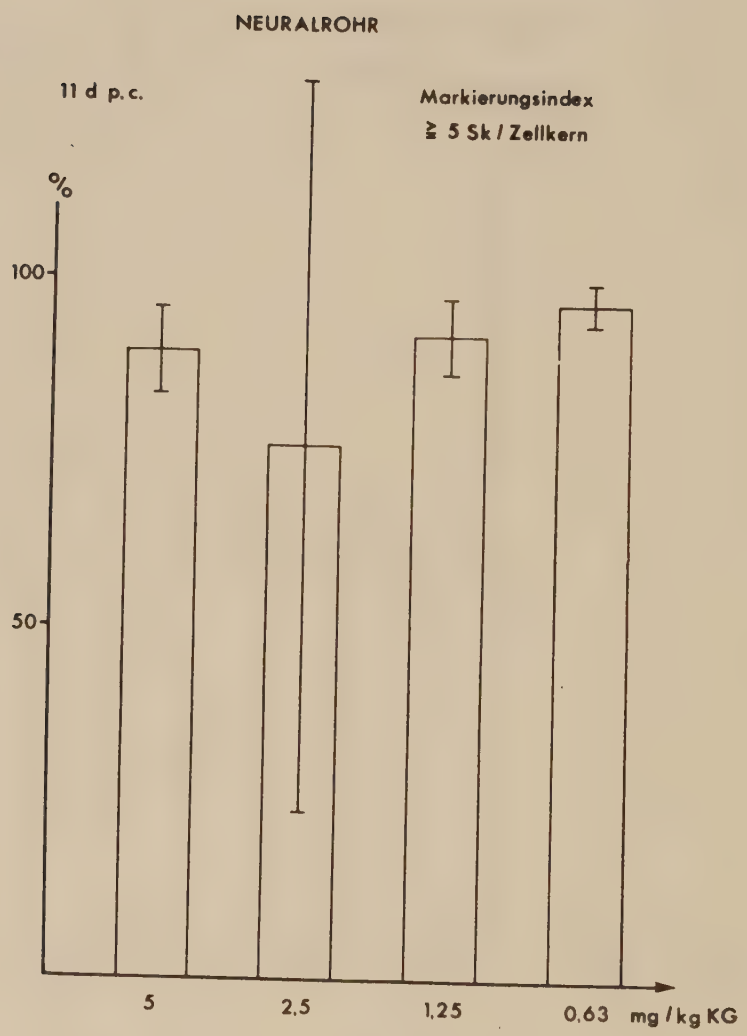


Abb. 36

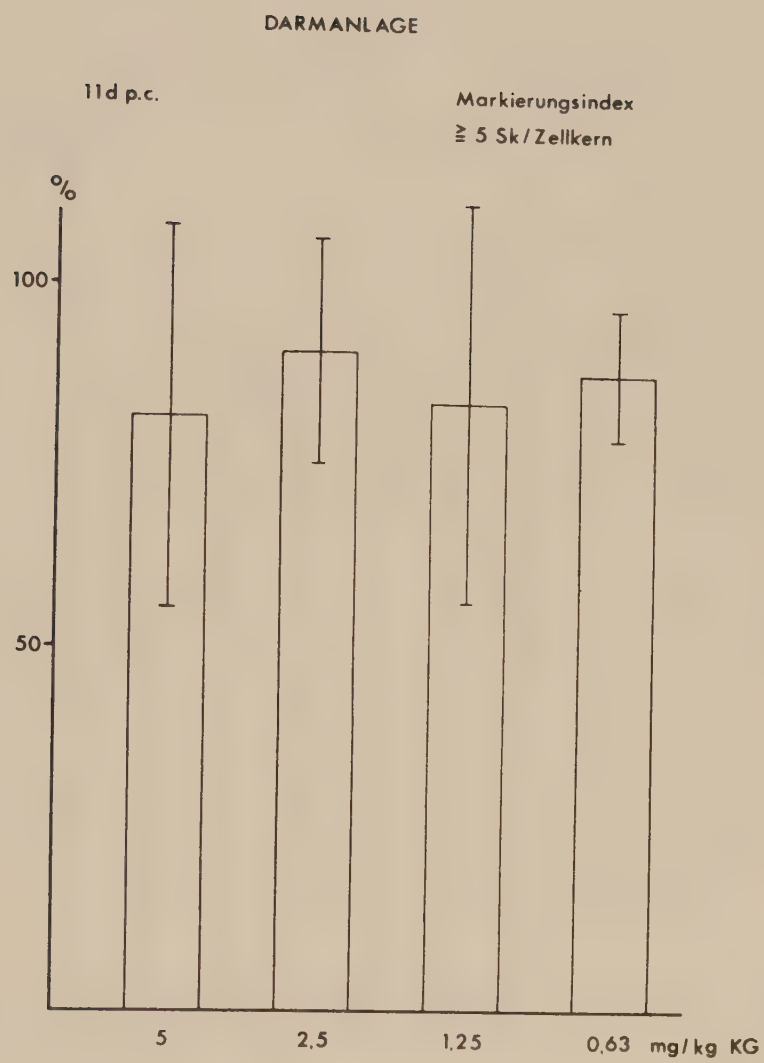


Abb. 37

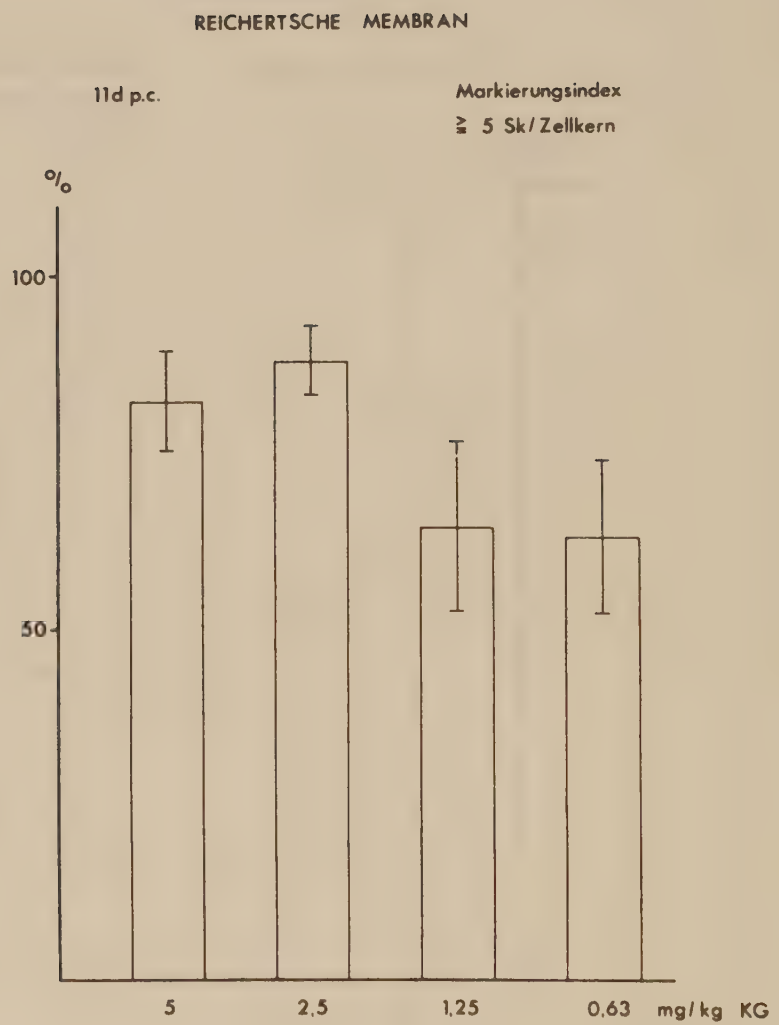


Abb. 38

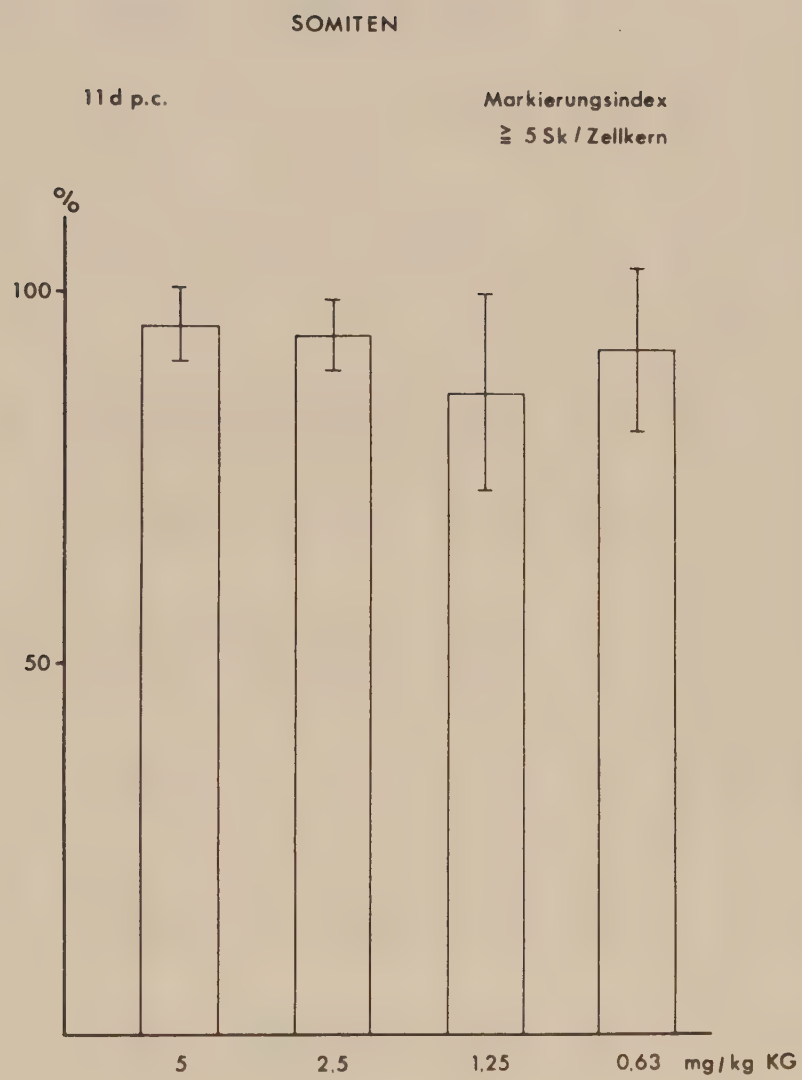


Abb. 39

		5,0 mg CdCl ₂ /kg KG	2,5 mg CdCl ₂ /kg KG	1,25 mg CdCl ₂ /kg KG	0,63 mg CdCl ₂ /kg KG	Kontrolle 1	Kontrolle 2
Tag 7 p. c.	prim. Ektoderm	86,94	86,77	70,45	91,65	76,6	73,8
Tag 8 p. c.	prim. Ektoderm	88,60	84,68	81,24	79,77	89,0	85,6
	prim. Entoderm	62,01	61,01	72,72	71,56	41,5	61,3
Tag 9 p. c.	Neuroektoderm	42,0	72,8	75,5	68,3	88,4	86,0
	Entoderm	35,2	63,4	93,3	84,4	84,0	80,3
	pariet. Entoderm	54,5	69,9	54,8	51,9	61,3	56,4
Tag 10 p. c.	Neuroektoderm	77,75	82,39	91,46	89,96	92,3	90,8
	embr. Entoderm	51,30	61,28	57,80	63,99	74,7	84,6
	extrae. Entoderm	40,01	57,19	62,20	71,51	64,6	65,3
	Mesoderm	59,91	65,59	65,37	75,07	86,6	89,4
	pariet. Entoderm	41,42	52,78	52,02	48,14	55,6	58,8
Tag 11 p. c.	Neuralrohr	89,4	75,8	91,5	96,1	85,5	90,4
	Somiten	95,3	94,2	86,4	92,1	89,3	90,3
	Darmanlage	81,8	90,9	83,6	87,7	77,0	78,2
	pariet. Entoderm	82,2	87,9	64,2	62,7	60,2	62,5

Tabelle 2

Die Tabelle 2 gibt die Werte für den ³H-Markierungsindex der ausgewerteten Gewebsverbände in Prozent an, wobei die zu einer CdCl₂-Dosis gehörigen drei Embryonen jeweils zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden. Zum Vergleich zeigen die letzten beiden Längsspalten die Werte des ³H-Markierungsindex der beiden Kontrollgruppen.

Gewebe	d p.c.	Ausprägung eines Trends	Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber signifikantem Trend (%)
Ektoderm	7	Ø	62,92
	8	Scheineffekt ⁻⁾	0,46**
	9	+++	0,33**
	10	++	0,91**
	11	Ø	63,55
Entoderm	8	Ø	15,96
	9	+++	0***
	10	+	1,66*
	11	Ø	66,15
Reichertsche Membran	9	Ø	76,78
	10	+	5,98(*)
	11	---	1,69*
Mesoderm	10	++	0,86**
	11	Ø	21,26
extraembryon. Entoderm	10	++	0,20**

Tabelle 3

Ergebnisse einer varianzanalytischen Untersuchung

In Spalte 1 sind die untersuchten Gewebsverbände, in Spalte 2 die Trächtigkeitstage aufgezeigt. Spalte 3 macht die Ausprägung eines Trends im Sinne der Hypothese eines bei steigender CdCl_2 -Dosis abfallenden ^3H -Markierungsindex deutlich. Spalte 4 gibt Aufschluß über die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums für die varianzanalytische Prüfung auf signifikanten Trend.

+++ stark abfallender Trend

++ mäßig abfallender Trend

+ schwach abfallender Trend

Ø kein erkennbarer Trend

--- gegenläufiger Trend

-) Scheineffekt: Wert für die höchste CdCl_2 -Dosis entspricht Wert der Kontrolle (siehe Seite 15).

(*) Irrtumswahrscheinlichkeit 10 %

* Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %

** Irrtumswahrscheinlichkeit 1 %

*** Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1 %

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gruppe	Dosen von CdCl ₂	Tote Feten	Lebende Feten	Exenze- phalie	offene Augen	Schädel- Mißbil- dungen	Wirbel- säulen- Mißbil- dungen	Rippen- Mißbil- dungen
	mg kg	Anzahl %	Anzahl %	Anzahl %	Anzahl %	Anzahl %	Anzahl %	Anzahl %
A	5,0	26 17,5	122 82,5	70 57,13	35 28,69	70 57,13	17 13,9	49 40,1
B	2,5	28 12	203 88,0	39 19,02	25 12,19	40 19,50	16 7,8	38 18,5
C	0,63	28 11,9	206 89,3	2 0,87	1 0,48	2 0,97	2 0,97	1 0,48
D	0,33	25 9,9	227 88,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
Kontrolle	Salzlg.	22 9,7	204 91,3	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0

Tabelle 4

Tabellarische Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse von Ishizu et al. an 18 Tagen alten Mäusefeten, die am 7. Trächtigkeitstag der Einwirkung von Cadmiumchlorid ausgesetzt waren. Die Versuchsgruppen A, B, C, D und die Kontrollgruppe setzten sich aus je 20 trächtigen Muttertieren zusammen (weiteres siehe Text). Spalte 1 gibt die Gruppe an, Spalte 2 die den Muttertieren verabfolgten Dosen, Spalte 3 die Anzahl der abgestorbenen Feten bzw. die Anzahl der feststellbaren rückgebildeten Plazenten und Nidationsstellen (Einnistungsstelle der Keimlinge in die Uterusschleimhaut), Spalte 4 die Anzahl der lebenden Feten, Spalte 5 die Anzahl der lebenden Feten mit Exenzephalie (Hirnprolaps bzw. -vorfall bei Hirnschädeldefekten), Spalte 6 die Anzahl der lebenden Feten mit offenen Augenlidern, Spalte 7 die Anzahl der lebenden Feten mit Schädelmißbildungen, Spalte 8 die Anzahl der Feten mit Mißbildungen im Bereich der Wirbelsäule und Spalte 9 die Anzahl der Feten mit Rippenmißbildungen.

Herrn Prof. Dr. med. W. Hilscher danken wir ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine hilfreiche Betreuung während der umfangreichen Untersuchungen sowie für seine Ratschläge und Anregungen.

Ferner gilt unser Dank Frau Hilscher, die uns bei der Lösung von Detailproblemen stets hilfreich zur Seite stand.

Herrn. Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter danken wir dafür, daß er uns den Arbeitsplatz und die Versuchstiere zur Verfügung stellte.

Ganz besonders möchten wir - stellvertretend für alle Mitarbeiterinnen des Instituts - Frau Rehbein unseren Dank aussprechen, die uns zu jeder Zeit bei der Lösung der technischen und organisatorischen Probleme eine große Stütze war.

Lebenslauf

Am 24.X.1949 wurde ich als Sohn des Diplom-Volkswirts Dr. Kurt Gerigk und dessen Ehefrau Edith, geb. Schwarz, in Dortmund geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule und wechselte dann auf das Max-Planck-Gymnasium in Dortmund. 1967 wechselte ich zum Fichte-Gymnasium in Hagen. Dort bestand ich 1969 das Abitur.

Im Sommersemester 1970 nahm ich das Hüttenwesenstudium an der Universität Clausthal-Zellerfeld auf. 1974 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. 1977 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, 1978 den ersten Teil der ärztlichen Prüfung und 1980 den zweiten Teil. Im Mai 1981 schloß ich mit dem Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung das Studium der Humanmedizin erfolgreich ab.

Lebenslauf

Am 18. November 1953 wurde ich als Sohn des Volksschullehrers Hermann Haverkamp und seiner Ehefrau Carola, geborene Misgeld, in Duisburg geboren. Im Frühjahr 1960 wurde ich in die Evangelische Volksschule am Bürgermeister-Wendel-Platz in Homberg am Niederrhein eingeschult. Vier Jahre später wechselte ich gleicherorts an das Franz-Haniel-Gymnasium, an dem ich den neusprachlichen Zweig besuchte und am 16. Mai 1972 mein Abitur ablegte.

Von Oktober 1972 bis Dezember 1973 leistete ich meinen Wehrdienst als Sanitätssoldat ab. Zum Wintersemester 1974/75 schrieb ich mich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn im Fach Agrarwissenschaften ein. Zwei Semester darauf erhielt ich einen Studienplatz im Fach Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. Ich bestand im März 1977 die Ärztliche Vorprüfung, im März 1978 den Ersten Teil und im März 1980 den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung. Im April 1981 schloß ich mit dem Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung das Studium der Humanmedizin erfolgreich ab.

Lebenslauf

Am 27.IX.1952 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Paul Schönwald und seiner Ehefrau Margret in Düsseldorf geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Katholische Volksschule Pempelfort und wechselte dann auf das Görresgymnasium in Düsseldorf. Dort legte ich 1972 die Reifeprüfung ab. Anschließend leistete ich meinen Wehrdienst ab und begann zum Wintersemester 1974 das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf. 1977 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, 1978 den ersten Teil des Staatsexamens und 1980 den zweiten Teil des Staatsexamens. Im April 1981 schloß ich mit dem Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung das Studium der Humanmedizin erfolgreich ab.

Lebenslauf

Am 23.XII.1950 wurde ich als Sohn des Assessors Arnold Spaether und dessen Ehefrau Liselotte, geb. Wesenberg, in Duisburg geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Kath. Volksschule an der Bismarckstraße und wechselte dann auf das Staatl. Landfermann-Gymnasium in Duisburg. Dort bestand ich 1971 das Abitur. Anschließend arbeitete ich 8 Monate in der Krankenpflege und nahm zum Sommersemester 1972 das Chemiestudium an der Universität Bonn auf. Zum Wintersemester 1975/76 begann ich im 3. Fachsemester das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. 1977 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, 1978 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung und 1980 den zweiten Teil. Im Mai 1981 schloß ich mit dem Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung das Studium der Humanmedizin erfolgreich ab.

